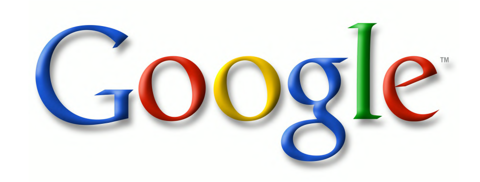

Google



Bibliothèque technologique

Lucien Lévy

Microbes et Distillerie

Georges CARRÉ & C. NAUD, Éditeurs


Ex-libris
Charles Atwood
Kofoid

MICROBES & DISTILLERIE

MICROBES

ET

DISTILLERIE

PAR

LUCIEN LÉVY

Docteur ès sciences, Ingénieur agronome,
Professeur à l'École nationale des Industries agricoles de Douai
et à l'Institut des fermentations de Bruxelles.



PARIS

GEORGES CARRÉ ET C. NAUD, ÉDITEURS

3, RUE RACINE, 3

—

1900


Ex-libris
Charles Atwood
Kofoid


SEAL OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
SEMPER VIRENS
1885

MICROBES & DISTILLERIE

Van Helmont a reconnu le premier qu'il se dégage des gaz dans la vinification, la digestion, les putréfactions, l'action des acides sur les carbonates. Il pensait que la production de ces gaz était due à un ferment.

R. Boyle, à la même époque, a prévu que celui qui connaîtrait la nature des ferments serait plus à même d'expliquer plusieurs maladies et entre autres les fièvres.

Becker (1628-1685) étudia la question et distingua l'effervescence produite par les acides sur les minéraux, la fermentation qui d'après lui avait pour source les végétaux, et enfin la putréfaction ayant pour origine les animaux.

Dans les fermentations, c'est-à-dire dans les réactions gazeuses ayant pour point de départ un végétal, il distingua deux sortes de fermentations :

1° La fermentation proprement dite des liquides alcooliques ;

2° L'acétification.

La fermentation d'après lui a pour cause un ferment et un excès d'alcool l'arrête.

Stahl. — Becker a eu comme élève *Stahl.* Celui-ci fit une théorie de la putréfaction, où il admit que la cause en est dans la transmission d'un mouvement partant d'un corps putréfié et se communiquant aux corps qui se putréfient.

Période expérimentale.

Toutes ces théories ne sont que des hypothèses s'appuyant sur un petit nombre d'observations. Les expériences véritables se sont introduites un peu plus tard dans la science.

Black (XVIIIe siècle) a montré que le gaz indiqué par Van Helmont était toujours le même ; il l'isola et l'étudia.

Lavoisier, en 1788, a cru reconnaître que $95^{gr},5$ de

sucre donnent à la fermentation 57gr,7 d'alcool, 35gr,5 d'acide carbonique et 1gr,5 de ce qu'il croyait être de l'acide acétique. Cette expérience et d'autres analogues lui ont inspiré son axiome : Rien ne se perd, rien ne se crée. Et cependant l'expérience de Lavoisier est inexacte ; si elle est conforme à la loi de la conservation de la matière c'est par suite d'une compensation d'erreurs.

Gay Lussac, l'inventeur des méthodes d'analyse organique, eut l'idée de se servir de ces méthodes pour vérifier l'équation de Lavoisier. Il crut reconnaître que cette équation était à peu près exacte et força ses nombres pour les rendre absolument conformes à l'équation.

Dumas. — Ce n'est qu'en 1828 que *Dumas*, refaisant l'expérience, constata une erreur grave. Il remarqua que si l'on part de 100 de sucre, on obtient un poids d'alcool et d'acide carbonique supérieur à 100. Il constata en effet que lorsque le sucre se transforme, il fixe de l'eau pour donner de la glucose (1)

$$C^{12}H^{22}O^{11} + H^2O = 2C^6H^{12}O^6 ;$$

c'est cette glucose qui subit la fermentation, d'après l'équation

$$C^6H^{12}O^6 = 2CO^2 + 2C^2H^5.OH.$$

Tous ces faits contribuent à faire connaître la fermentation alcoolique, mais sans en indiquer la cause et encore moins celle de toutes les autres fermentations dont on a à s'occuper.

Gay Lussac a cru trouver aux fermentations une cause chimique à la suite de l'expérience suivante :

Il prend une éprouvette pleine de mercure. Il y introduit quelques grains de raisin qu'il écrase en agitant

---

(1) On sait qu'en réalité, il y a glucose et lévulose.

l'éprouvette, il obtient ainsi un peu de moût. Il observe l'éprouvette pendant quelques jours et ne constate rien. Il laisse alors rentrer une bulle d'air et au bout de quelque temps le moût fermente. Il en conclut que pour que la fermentation se produise il faut de l'air et que celui-ci intervient chimiquement.

Pasteur. — *Pasteur* a refait cette expérience et a constaté son exactitude. Il a d'abord pensé qu'en introduisant de l'air dans l'éprouvette, on introduit en même temps une petite quantité de levure et que la cause de la fermentation était cette levure ; l'air n'étant que le véhicule.

Cette manière de voir exigerait que partout dans l'air il y eût de la levure. Or Pasteur lui-même a démontré qu'il n'en est rien. Des séries de 20 matras, chargés de bouillon, stérilisés et fermés, ont été ouverts puis refermés dans des lieux très différents, tels que le sommet du Mont-Blanc et le laboratoire de Pasteur à l'École Normale. Ces ballons étudiés ensuite ont montré que l'ensemencement n'avait eu lieu ni partout, ni dans les mêmes proportions.

Pasteur, corrigeant sa première manière de voir, montra que la levure était introduite par les pellicules des grains de raisin, mais qu'il faut cependant de l'air pour la rendre active. En effet :

Des raisins lavés à l'eau bouillante ne donnent pas lieu à la fermentation. Si on y ajoute une goutte de pulpe prélevée à l'intérieur d'un grain avec toutes les précautions voulues par un tube flambé et effilé, l'expérience ne marche également pas. Mais introduit-on une goutte d'eau de lavage que la réaction se déclare.

La levure est donc sur la pellicule du raisin et puisque l'expérience de G. Lussac ne marche qu'après la rentrée d'air, c'est que celui-ci joue un rôle dans la fermentation.

De la levure. — Comment cette notion de levure s'est-elle introduite en *microbiologie ?*

1° D'une part, depuis longtemps on savait qu'à la fin des fermentations on trouve un dépôt. Dès 1789, *Fabroni* le comparait au gluten. En 1803, *Thénard* attribuait à ce dépôt une composition animale et remarquait que le dépôt produit par une fermentation de moût sucré est analogue au dépôt de la fabrication de la bière;

2° D'autre part, la levure elle-même était connue depuis longtemps.

En 1680 *Löwenhock*, l'inventeur du microscope, a vu des cellules de levure en observant avec son instrument des dépôts de moûts de bière.

En 1814 *Kieser* a décrit de nouveau ces cellules.

En 1826 *Desmazures* étudia ces levures et les classa au point de vue botanique (Mycoderma Cerevisiœ).

3° Enfin en 1835, on commença à se faire une idée sur la relation existant entre la levure proprement dite et la fermentation.

Cagniard-Latour; Schwann et Kutzing. — *Cagniard-Latour* en France, *Schwann* et *Kutzing* en Allemagne examinèrent au microscope la levure et constatèrent tous les trois qu'elle était formée de globules ovoïdes; Cagnard-Latour remarqua qu'elle se reproduisait par bourgeonnement et il pensait que la fermentation était un phénomène de végétation.

A propos de son étude sur la levure, *Schwann* a énoncé un certain nombre de faits. Dans l'expérience de Gay-Lussac, si on introduit dans l'éprouvette une bulle d'air, préalablement chauffée au rouge, la fermentation n'a pas lieu parce que, ajoute-t-il, il n'y a plus de germe dans l'air. D'après ce que nous savons, cette expérience est inexacte.

Il remarqua, en outre, que le dépôt des cuves de fermentation contient des globules de levure et il ajouta que

c'est cette levure qui produit la fermentation et que, sans elle, il n'y a jamais fermentation. C'est donc Schwann qui a le premier indiqué la relation de cause à effet qui existe entre la levure et le jus sucré.

Helmholtz. — En 1843, *Helmholtz* s'occupant des fermentations fit un raisonnement qui l'a conduit à des résultats erronés. Puisque l'on prétend, dit-il, que les fermentations sont dues à des microbes, prenons un vase partagé en deux parties par une cloison poreuse. Mettons d'un côté un liquide non fermenté et de l'autre côté un liquide en fermentation.

Si la fermentation est due à un microbe, celui-ci ne passera pas à travers la membrane poreuse et la fermentation ne pourra pas se propager. Si au contraire elle est due à une exhalaison quelconque, ce produit traversera la cloison et la fermentation se propagera.

Le raisonnement pèche en deux points. En premier lieu un produit chimique peut ne pas traverser la membrane, et, en second lieu au contraire, il y a des microbes qui peuvent la traverser.

Il essaya de vérifier sa déduction par l'expérience. Avec le moût ordinaire la propagation n'a pas lieu ; il en concluait que l'agent de la fermentation alcoolique est un être organisé. Au contraire, avec un bouillon en putréfaction, la propagation a lieu, il en concluait à l'absence de microbes, à l'effet d'une exhalaison.

Se basant sur ces expériences, Helmholtz établit une différence entre les deux sortes de fermentations par microbes et par exhalaisons.

L'idée de la nécessité d'un microbe pour produire la fermentation n'a pas été admise sans résistance.

Liebig. — *Liebig* n'admit pas l'idée des fermentations par les microbes. Il objecta à Helmholtz qu'il n'y a aucune raison d'admettre un microbe dans un cas et de n'en pas admettre dans l'autre.

Il objecta ensuite que si la fermentation alcoolique que subit le sucre est due à un microbe, il devrait en être de même pour les autres fermentations (lactique, butyrique, etc., etc.). Or à cette époque les ferments correspondants à ces fermentations n'étaient pas encore soupçonnés.

Liebig tira encore une objection d'une expérience due à *Colin* (1828). Elle consiste en ceci : mettons en fermentation alcoolique un moût sucré en l'ensemençant avec de la matière plus ou moins en putréfaction. La fermentation alcoolique s'accomplit (1).

Mais si Liebig niait la nécessité de la levure dans la fermentation alcoolique, il ne pouvait pas nier sa présence ; seulement il ne lui attribuait aucun rôle dans l'acte de la fermentation. Il prétendait que cette levure se formait aux dépens du gluten (2) et que tant qu'elle était vivante elle n'agissait pas pour provoquer la fermentation. Ce n'était que lorsqu'elle était morte, c'est-à-dire à l'état de putréfaction, qu'elle produisait la fermentation. Il basait son raisonnement sur une expérience de Thénard. Celui-ci avait pris 20 grammes de levure qu'il avait mis dans 100 grammes de sucre dissous. Il laissait fermenter, pesait le dépôt de levure après fermentation et trouvait un poids de $13^{gr},3$, plus petit que le poids du début. Il prenait de nouveau ce poids de $13^{gr},3$ et le mettait dans un moût sucré. A la fin de l'opération le dépôt ne pesait plus que 10 grammes et la fermentation était d'ailleurs fort ralentie.

Dans cette expérience le poids de levure diminue parce que les matières alimentaires nécessaires à la levure, ne sont pas en quantités suffisantes.

C'est ce qui a conduit Liebig à croire à la putréfaction

---

(1) Cela tient à ce qu'il y a des levures dans la matière putréfiée.

(2) Matières albuminoïdes.

des levures pendant la fermentation et adoptant l'idée de Stahl, il expliquait celle-ci par la transmission d'un mouvement de décomposition de la levure putréfiée vers le moût.

Liebig n'admettait donc pas le rôle vital de la levure.

Il poussait son idée plus loin : le dépôt de levure putréfiée devait d'après lui produire d'autres fermentations que la fermentation alcoolique. En d'autres termes, Liebig niait non pas la spécificité de la levure, puisqu'il ne croyait pas à celle-ci, mais la différentiation des différentes fermentations.

Pasteur contre Liebig. — C'est contre cette dernière idée de Liebig que Pasteur s'est élevé. Le point de départ des travaux de Pasteur a été non pas l'idée de démontrer exclusivement l'influence de la levure dans la fermentation alcoolique, mais de démontrer la spécificité des différents ferments. Le premier mémoire date de 1858 et porte sur la fermentation lactique. Il établit que la production de l'acide lactique est due à un ferment spécial : le ferment lactique.

Quand on prend uue goutte de liquide en fermentation lactique et qu'on l'ensemence dans un moût sucré la fermentation se propage ; une goutte de ce 2e liquide peut elle-même propager la fermentation lactique dans un 3e bouillon et l'on peut faire autant de cultures successives que l'on veut : ce qui établit la disproportion entre le poids du ferment et le poids du sucre transformé. En outre c'est toujours de l'acide lactique qui se forme, ce n'est pas par exemple de l'acide butyrique, à la condition du moins que le ferment soit pur. Ce ferment ne se développe que dans des liqueurs appropriées. Il préfère les milieux alcalins ; c'est le contraire pour la levure de bière qui préfère les milieux acides.

Enfin Pasteur ajoute que l'huile essentielle de jus d'oignon empêche la fermentation lactique (1re idée des antiseptiques).

En 1859, Pasteur commence une étude sur la fermentation alcoolique. Il abandonne cette étude et la reprend en 1876. Il réussit à provoquer la fermentation alcoolique dans un milieu sucré contenant seulement des matières minérales (cendres de levure calcinée) destinées à la nourriture de la levure à l'exclusion de toute matière azotée. Dans ce milieu où n'existent pas de matières en putréfaction, il produit la fermentation alcoolique en introduisant une petite quantité de jus sucré en fermentation.

Cette expérience est absolument contraire aux idées de Liebig puisqu'ici il n'y a pas de putréfaction possible. En effet, 1° il n'y a pas de matière azotée et 2° l'on observe que la levure se multiplie, ne se détruit pas et ne peut par conséquent pas entrer, elle-même en putréfaction.

Pasteur a fait d'autres expériences. Mettons du lactate de chaux dans de l'eau, sans matière organique et ensemençons avec une goutte d'un bouillon en fermentation butyrique. Nous remarquons une fermentation caractérisée par un dégagement d'acide carbonique et d'hydrogène, le liquide devient acide et contient de l'acide butyrique. Au microscope on observe des éléments onduleux.

Donc dans cette culture particulière où pour matière organique il n'y avait que de l'acide lactique, on a pu produire la fermentation butyrique avec une goutte d'un liquide butyrique. Il existe donc un nouveau microbe spécifique. Si l'on essaie de le cultiver dans un milieu aéré il ne se développe pas. Il ne se développe qu'en l'absence de l'air. On distingue donc les microbes *anaérobies*, comme le ferment butyrique, des microbes *aérobies* comme la levure ou le ferment lactique.

Une autre expérience consiste à mettre dans de l'eau du blanc d'œuf, de la craie et quelques gouttes d'un liquide en putréfaction. On a une nouvelle fermentation

qui est une putréfaction. On observe des gaz nauséabonds et si on examine le liquide au microscope on voit un certain nombre de microbes. La putréfaction a donc encore pour origine des microbes.

Enfin, Pasteur a étudié la fermentation acétique ; il a démontré que le vinaigre se forme sous l'influence d'un microbe spécifique, le mycoderma aceti.

Cette expérience est d'une grande portée contre les idées de Liebig, car celui-ci pensait que les fermentations étaient dues à un agent résultant de l'oxydation du gluten.

Or la formation de l'acide acétique est une véritable oxydation de l'alcool que l'on peut même obtenir par des réactifs chimiques (noir de platine). Donc la formation de l'acide acétique peut résulter d'un microbe ou d'une oxydation de l'alcool ; deux faits contraires aux idées de Liebig : oxydation du gluten et action de celui-ci putréfié.

On voit que toutes les expériences de Pasteur tendent à établir la nécessité d'un microbe spécifique pour chaque fermentation.

Néanmoins Liebig a répliqué à Pasteur. Il admet l'utilité de la levure dans la fermentation alcoolique : pendant que la levure vit, le sucre du milieu est absorbé par la levure et se combine au protoplasma. Puis quand la levure commence à mourir, la combinaison entre le sucre et le protoplasma se disloque en acide carbonique, alcool et matières albuminoïdes.

Pour Liebig l'acte vital de la fermentation est dans l'assimilation du sucre ; la formation d'alcool est une décomposition chimique qui n'a lieu qu'à la mort de la cellule.

Claude Bernard. — Pasteur supposait ceci : la levure mise dans le liquide sucré s'entretient et se multiplie et pour cela assimile une certaine quantité de sucre ; le reste du sucre est absorbé et rendu par la levure vivante à l'état

d'alcool et d'acide carbonique. Pasteur admettait donc, avec Liebig d'ailleurs, que tout le sucre passe dans les cellules. Or ceci est difficile à comprendre, étant donnée la disproportion de poids entre la levure et le sucre. Cette objection est due à Claude Bernard et trouve un grand appui dans l'expérience de Büchner.

Büchner; la zymase. — *Büchner* s'est proposé d'étudier le contenu des cellules de levure, il eut d'abord l'idée de les ouvrir par congélation. Mais l'opération ne marcha pas bien. Il eut alors recours au procédé suivant: la levure mêlée à du sable fin et à une sorte de tripoli, soumise pendant 2 heures à l'action d'un fort pilon d'acier dans un mortier d'agate, puis à l'action d'une presse donnant 60-90 kilogrammes par centimètre carré, donne, sur les 80 pour 100 contenus dans la levure, environ 50 pour 100 de son poids d'un liquide que Büchner a nommé zymase. Ce sont les dernières parties pressées qui sont les plus actives.

Le jus filtré au papier est recueilli dans un vase refroidi dans la glace; c'est un liquide presque limpide, jaune, ayant l'odeur de levure. Il contient (1) beaucoup d'acide carbonique qui peut se dégager à 40°; si on le chauffe, il se prend en masse quoique non coagulé dans l'ensemble. Il réagit sur l'eau oxygénée seule ou en présence de la teinture de gaïac, preuve qu'il contient des diastases (on sait d'ailleurs qu'il y a de la sucrase et de la maltase). Il contient sans doute une oxydase car le suc brunit à l'air. Enfin il doit contenir des peptases, car une goutte de ce suc mise sur de la gélatine chloroformée la dissout.

---

(1) Le glycogène de la levure fermente dans la zymase, cela peut produire 0gr,5 d'acide carbonique pour 100 centimètres cubes de zymase en quatre jours.

Mais la propriété importante de la zymase est celle qui est mise en évidence par les expériences suivantes :

Prenons 200 centimètres cubes de ce suc fraîchement préparé et ajoutons-y 200 centimètres cubes de saccharose à 75 pour 100. — Après dix minutes à peine, un brusque dégagement d'acide carbonique a lieu, et si on opère à température assez basse il peut se prolonger 7-8 jours.

Comparons cette action à celle de la levure, elle n'agirait pas sur un milieu aussi concentré en sucre, en tout cas elle agirait graduellement et non brusquement.

Voici une autre expérience ; dans un tube à essai, mettons 10 centimètres cubes de zymase, et versons quelques grains de poussière de sucre ; immédiatement l'action a lieu. La levure n'agirait pas de suite.

La filtration de la zymase à la porcelaine lui enlève beaucoup d'activité dès le début et l'activité décline de plus en plus.

La zymase résiste assez bien à la chaleur et au vide à 22 degrés. En solution glycérique, elle agit presque comme à l'état pur, les solutions sucrées très riches (les sucres très solubles sont fermentescibles) la conservent.

Elle agit avec autant d'activité sur la glucose que sur la lévulose. Cela est contradictoire avec ce qui arrive pour certaines levures qui donnent la prépondérance à l'un ou l'autre sucre, ordinairement à la glucose. Mais il faut remarquer que la zymase étudiée par Büchner provient de levure de Munich aussi active sur la lévulose que sur la glucose.

Elle ne réagit pour ainsi dire pas sur l'amidon ; mais agit déjà sensiblement sur l'amidon soluble ou sur les dextrines.

Abandonnée à-elle même, la zymase s'affaiblit rapidement par suite sans doute de l'autodigestion due aux peptases signalées plus haut.

On a objecté à la manière de voir de Büchner un certain nombre de faits.

On lui a dit : N'est-ce-pas quelques cellules de levure égarées qui agissent? Or si la levure en grande quantité n'a pas d'action brusque, on ne peut concevoir qu'il en soit autrement des cellules égarées. De plus en centrifugeant avec soin le suc de levure, on a un liquide ayant toutes les propriétés du suc brut.

Lang a montré qu'en employant 10 fois plus de levures qu'il n'en passe dans la zymase on ne peut obtenir une action comparable à celle-ci.

De plus la zymase fait fermenter des liquides sucrés très concentrés par exemple, elle peut fermenter des liquides à 30, 40, 60 pour 100 de sucre, chose que ne ferait pas la levure. Il est vrai que l'action de la zymase est ralentie par une dose de sucre supérieure à 30 pour 100 (1) (celle-ci dépend d'ailleurs de la nature de la levure originelle) mais ce n'est pas étonnant. Une autre réponse à cette objection est celle-ci : les levures chauffées 6 heures à 95°, sont incapables de végéter, mais elles font fermenter si on les écrase. Cela tient à la zymase qui résiste assez bien à la température de 95° pendant 6 heures.

Une objection est à signaler : n'est-ce pas des éléments protoplasmiques qui passent et qui agissent. Mais la réaction a lieu en présence par exemple d'arsénite de potasse à 2 pour 100 qui gênerait toute action protoplasmique (dans certaines expériences, des contradicteurs de Büchner ont trouvé que les antiseptiques ne gênent pas toujours les

---

(1) La concentration la plus favorable à l'action de la zymase à 23° est celle d'une solution sucrée à 30 pour 100 avec 1 pour 100 de toluène.

Büchner appelle pouvoir ferment du suc de levure desséché, le poids d'acide carbonique dégagé en 24 heures par un gramme de zymase dissous dans 7 centimètres cubes d'eau avec 30 pour 100 de saccharose et 1 pour 100 de toluène.

levures elles-mêmes ; en ce qui concerne l'arsénite de potasse, corps qui coagule le protoplasma, cela tient à ce qu'il y avait un excédent de levure par rapport au poison) (1).

On a encore objecté que certaines levures donnent des sucs inactifs. Cela tient à ce que l'on a opéré sur des levures de races peu actives et vieilles et que l'on a insuffisamment disloqué les cellules ; en effet dans les cellules vieilles, une couche durcie de protoplasma double la membrane, et pour ouvrir celle-ci il faut comprimer plus fort que pour une membrane de cellule jeune.

Enfin on a objecté que certains sucs sont plus actifs que d'autres. Cela n'a rien de plus extraordinaire que le même fait chez les différentes espèces de levures.

On voit que le travail de Büchner explique la fermentation sans être obligé d'admettre l'assimilation totale du sucre.

Conclusion.

On est conduit à comprendre le rôle de la levure de la manière suivante : elle se multiplie en absorbant un

---

(1) L'action de l'arsénite de potasse est assez variable ; voici à ce sujet un certain nombre d'expériences :

1° Du suc de levure dilué de son volume d'eau ne perd pas de son activité ; le même additionné de 2 pour 100 d'arsénite résiste bien. Or l'addition simultanée de l'eau et de l'arsénite fait tomber l'activité à 0.

C'est sans doute par suite de la non absorption de l'arsénite par les albuminoïdes plus étendus ;

2° De la zymase affaiblie par le temps ou par une température de 35° est très atténuée par l'arsénite à 2 pour 100 ;

Il y a sans doute une raison du même ordre que dans le cas précédent.

Mais si on ajoute le sucre à faire fermenter en même temps que l'arsénite, la fermentation a lieu. Y a-t-il donc combinaison du sucre et de l'arsénite ;

3° Dans leurs 1res expériences, les auteurs ont indiqué que l'arsénite gêne la fermentation de la glucose. Actuellement, ils trouvent le contraire, ils pensent que la différence tient à ce qu'autrefois ils avaient du suc de pression et qu'aujourd'hui ils emploient du suc broyé à la main.

peu de sucre ; pour effectuer son développement, elle en absorbe une autre quantité en même temps que des matières azotées pour constituer des enzymes et ce sont ces diastases qui agissent. Il n'est pas nécessaire que tout le sucre soit assimilé, il suffit qu'il diffuse à l'intérieur des cellules.

De tout ce qui précède, il convient de retenir ceci :

Toute fermentation est due à un microbe spécifique. Ce microbe ne se développe que dans des conditions déterminées, emploie une partie du milieu nutritif à se multiplier, une autre partie à constituer des diastases qui décomposent d'une certaine manière certains éléments du milieu nutritif.

ORIGINE DES MICROBES

Une des grandes objections à cette théorie microbienne est celle tirée des fermentations spontanées. On peut se demander d'où vient le microbe. Il vient ordinairement de l'air, mais il peut provenir du sol, de l'eau, etc...

La présence des microbes dans l'air a été établie par Pasteur.

Déjà, avant lui, on croyait qu'une bulle d'air chauffée au rouge ne pouvait faire réussir l'expérience de Gay-Lussac ; il en était de même d'une bulle ayant traversé de l'acide sulfurique, du coton, de l'amiante, etc., mais on n'avait pas démontré d'une manière directe l'existence des germes dans l'air. C'est à Pasteur, qui a étudié la question à propos de la théorie des générations spontanées, que revient l'honneur de cette découverte.

En 1745, Needham a fait l'expérience suivante : il prit un flacon où il mit de la matière organique et y introduisit quelques gouttes de matières en putréfaction. Il ferma le flacon et le mit sous la cendre chaude. Il y eut putréfaction. Il disait alors : S'il y a des germes dans l'air, ils sont détruits puisqu'on a chauffé. Puis-

qu'ayant détruit les germes il y a putréfaction, c'est qu'il y a eu génération spontanée.

Spallenzani fit une objection, en chauffant davantage on n'observe rien ; tous les germes n'ont donc pas été détruits dans la 1re expérience mais ils le sont dans la 2e.

Needham répondit en disant qu'en chauffant à une température trop élevée, on détruisait la force végétative des liqueurs et qu'on altérait l'air. Cette théorie était restée à l'état latent jusqu'au moment où elle fut reprise par Pouchet de Rouen. Pour la combattre, Pasteur fit les expériences suivantes :

Il prend un tampon de coton-poudre, le met dans un tube et aspire l'air à travers. Il reprend le coton-poudre, le dissout dans l'éther et étudie le liquide au microscope. Il voit des microbes qui ne peuvent venir que de l'air.

Il fit une autre expérience. Il prend un ballon contenant un bouillon de culture et le relie à un tube qu'il peut chauffer au rouge ; il porte le ballon à l'ébullition de manière à chasser l'air puis il laisse rentrer de l'air en le faisant passer dans un tube porté au rouge ; il ferme le ballon et le laisse en repos ; il n'observe rien. Puis il ouvre le ballon, y laisse tomber un tampon de coton-poudre et referme. Il y a putréfaction. Donc, les germes de l'air sont capables de produire la putréfaction et lorsqu'il n'y a pas de germes, il n'y a pas putréfaction. On peut prendre de l'amiante au lieu de coton. On arrive encore au même résultat ; ce n'est donc pas la nature du coton-poudre qui intervient.

La présence des microbes dans l'eau, sur les objets les plus divers, a été successivement prouvée, de telle sorte que l'objection à la théorie microbienne tirée de l'origine des microbes n'a plus aucune importance.

En ce qui concerne la distillerie, les microbes proviennent soit de l'air, soit de l'eau, soit des matières premières utilisées.

CULTURE DES MICROBES

Méthodes de séparation.

Pour étudier les microbes il faut les séparer. Nous allons dire un mot des principales méthodes employées :

Première méthode (Pasteur). — *Basée sur l'inégal développement des différentes espèces dans certains milieux et sur l'emploi de cultures successives.*

Exemple : Du moût de bière additionné d'acide tartrique est encore propre au développement de la levure de bière, mais devient très défavorable au développement des bactéries (1).

Si l'on introduit dans ce milieu de culture une goutte d'un liquide contenant par exemple 10 cellules de levure et 10 de ferment butyrique, la levure va profiter du milieu plus que le ferment butyrique. Si l'on prélève de cette culture une goutte, elle contiendra, au lieu de 10 cellules de levure et 10 cellules de ferment butyrique, par exemple 45 cellules de levure et 5 de ferment butyrique. Si l'on emploie cette goutte pour ensemencer un 2e bouillon, l'effet va s'exagérer et il arrivera certai-

---

(1) M. Syrie dans une étude récente sur l'élimination par cultures successives du S. Pastorianus, en présence du Frohberg, a constaté des résultats fort curieux.

Il constate par exemple qu'à 25° un ensemencement fait par 899 Frohberg et 1 Pastorianus, ne laisse apparaître aucune spore de Pastorianus pendant 15 jours, mais que cette espèce reprend le dessus à la fin de la fermentation.

A 5°, avec un ensemencement de 399 Frohberg et 1 Pastorianus on ne retrouve plus de Pastorianus même après 42 jours. Enfin avec un ensemencement plus riche en Pastorianus, celui-ci disparaît et reparaît vers le 28e jour.

Ces expériences montrent combien la méthode par cultures successives peut être trompeuse.

nement qu'après 3 ou 4 cultures, une goutte prélevée dans la dernière aura des chances d'être exclusivement composée de levure. Ce n'est pas fatal et il faudra toujours vérifier que la culture ensemencée par cette dernière goutte est une culture pure de la seule espèce désirée.

Pasteur a employé cette méthode pour purifier de la levure de bière. Celle-ci était lavée plusieurs fois avec de l'eau sucrée diluée à 10 pour 100, puis traitée par la méthode.

Deuxième méthode. — *Basée sur l'influence de la température sur les différentes espèces.*

Dans l'urine il existe un certain nombre de microbes décomposant l'urée. Il y en a deux importants : l'un qui est un bacille et l'autre un micrococcus.

Le premier résiste à 80°, le second ne résiste pas. De là un moyen de séparer le premier.

Troisième méthode. — *Méthode des gouttelettes diluées.*

Je suppose qu'on ait un bouillon de culture contenant plusieurs microbes. Si le bouillon est très concentré, on trouvera toutes les espèces dans une goutte. Mais quand le bouillon est assez dilué pour qu'en général une goutte ne contienne qu'un microbe, on a, en ensemençant avec une seule goutte, des chances d'avoir une culture pure d'une seule espèce. Mais il faut vérifier le résultat car il peut se faire qu'une goutte même diluée contienne 2, 3 microbes.

La méthode a été complétée par Lindner. Il peut arriver que la goutte contienne par exemple deux microbes. Mettons-la sur un milieu solide, tel qu'une plaque à base de gélatine. Par suite de l'étalement de la goutte, les microbes vont être déposés en des points différents et comme leur déplacement propre s'ils sont mobiles, ou mécanique s'ils ne le sont pas, se trouve gêné, ils resteront isolés, se multiplieront chacun à leur place et fourniront des colonies qui, au début, ne seront pas mé-

langées. En se servant de celles-ci pour un ensemencement ultérieur on aura séparé les espèces (1).

Cette méthode a été encore améliorée. On emploie des milieux pouvant être solides ou liquides à volonté. On ensemence dans un de ces bouillons et on agite.

Les différents microbes se trouvent espacés. Cela fait, on répand le milieu liquide sur une plaque de verre et on le laisse se figer de sorte que les microbes sont emprisonnés en des points différents. On s'arrange ordinairement de manière que ces plaques de verre soient telles qu'on puisse les regarder directement au microscope.

D'autres fois, au lieu de répandre la culture sur une grande plaque, on la répand sur un couvre-objet de microscope et une fois la culture figée on place le couvre-objet sur une lamelle de microscope creusée d'une cuvette contenant une goutte d'eau. La culture se trouve ainsi enfermée dans un milieu humide et peut se développer. On n'a qu'à l'observer de temps en temps. Hansen emploie des gouttes qui à la température de culture redeviennent liquides, l'adhérence suffisant pour les empêcher de tomber.

Dans ce cas, lorsqu'on veut observer la culture, on retire la chambre humide de l'étuve, on la laisse figer et on observe directement au microscope.

Méthodes de stérilisation.

Avant de faire une culture il faut stériliser les vases où doit se faire cette culture.

---

(1) Il faut remarquer que les cultures sur gélatine imposent souvent aux microbes des formes spéciales ; les mycélium poussant par les extrémités, à cause de la résistance éprouvée tendront à donner des ramifications rectilignes; tandis que les bacilles qui s'allongent sur toute leur longueur

Les méthodes sont peu nombreuses. Les unes sont basées sur l'emploi de la chaleur, les autres sur celle des filtrations.

Chaleur sèche. — On peut employer la *chaleur sèche*. Pour l'air, le passage dans un tube rouge est ce qu'il y a de mieux. Pour un petit objet comme un fil de platine on se contente de le passer dans une flamme de bec Bunsen ou de lampe à alcool.

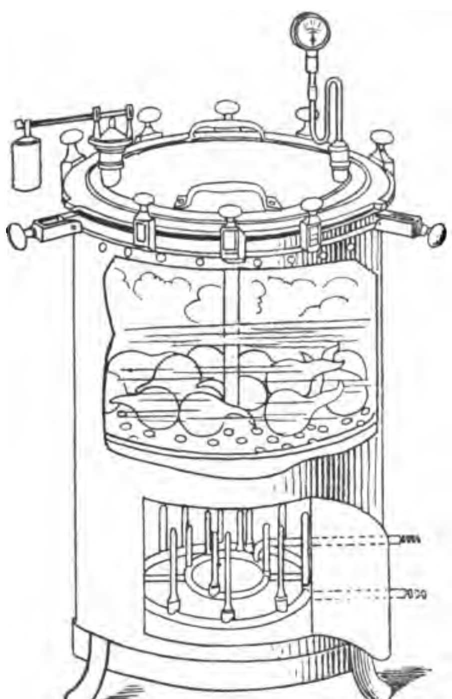


Fig. 1. — Autoclave Chamberland.

Pour un grand objet on le met dans un four à flamber. C'est un appareil à double paroi chauffé par les gaz chauds d'un réchaud à gaz et où l'on peut porter les appareils à 120°. Chaque fois qu'on veut stériliser un vase ouvert il faut avoir soin de le fermer avec un tampon de coton pour empêcher au refroidissement l'air de ramener des microbes.

Chaleur humide. — On peut employer la *chaleur humide* et chauffer les appareils sous pression dans des autoclaves contenant de l'eau (fig. 1). On peut aussi employer la méthode de Tyndall.

---

tendront à se courber et que les cellules plus ou moins rondes et bourgeonnantes telles que les levures formeront des colonies circulaires denses.

Suivant la nature du liquide on chauffe de 58° à 100°. En général la plupart des microbes sont tués, mais les spores peuvent résister, de sorte que le lendemain le milieu est de nouveau infecté.

On chauffe de même les 2e, 3e, 4e jours. Au bout de ce temps l'appareil est en géneral stérilisé. Néanmoins avant de s'en servir il faut en faire la vérification.

Filtration. — Quant à la filtration on peut la faire dans des bougies de dégourdi de porcelaine ou d'amiante ou dans des vases de matières analogues et de forme sphérique. Ceux-ci sont moins bons que les premiers, ayant moins de surface. On fait traverser les liquides soit de l'intérieur à l'extérieur ou inversement, la 2e méthode valant mieux à cause du nettoyage. On emploie soit la pression sur le liquide à filtrer, soit le vide sur le liquide filtré qui doit toujours être recueilli dans un vase stérilisé.

On peut aussi filtrer à travers une sorte de tripoli le Kieselguhr que l'on calcine et que l'on emploie comme le noir.

Vases à cultures.

Il y a lieu de distinguer entre les cultures aérobies et les anaérobies.

Vases à cultures aérobies. — Pour faire les cultures aérobies on se sert d'un certain nombre de vases différents.

Les uns sont des appareils ouverts qu'on ferme par un tampon de coton : tels sont les tubes à essai, les vases coniques, les tubes à essai étranglés vers le bas pour la culture sur pomme de terre, les simples matras à bords rodés, les matras Fernbach disposés pour faire circuler de l'air au-dessus de la couche de liquide (fig. 2, 3, 4, 5).

D'autres sont fermés par un bouchon extérieur portant un tube étroit pour le dégagement des gaz ; ce tube est

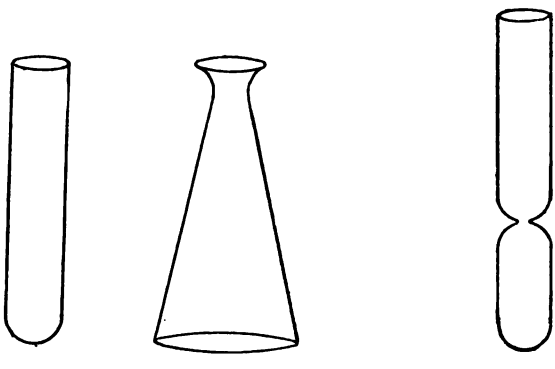


Fig. 2. — Tube à essai. Vase conique.

Fig. 3. — Tube à culture sur pomme de terre.

lui-même obturé par un petit tampon de coton : tels sont les matras de Chamberland (fig. 6) et de Hansen (fig. 7).

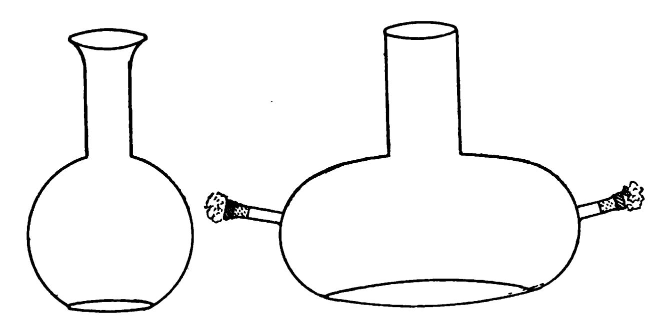


Fig. 4. — Matras ordinaire rodé.

Fig. 5. — Vase Fernbach.

Lorsqu'on doit étudier les gaz dégagés, on emploie le ballon à col de cygne de Pasteur ; une tubulure latérale permet l'ensemencement ; elle est fermée par un bout de

caoutchouc portant un morceau de baguette de verre (fig. 8).

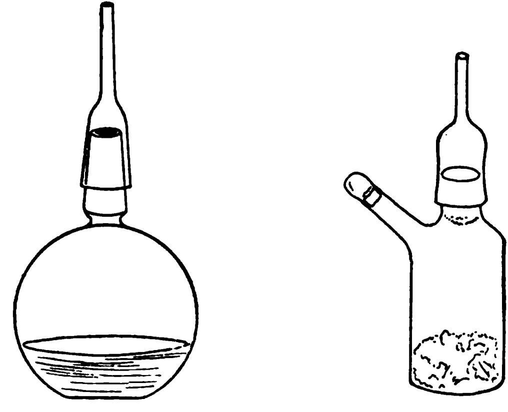


FIG. 6. — Matras Chamberland. FIG. 7. — Matras Hansen.

Si on veut étudier en milieux solides, on utilise des tubes à essais à bords rétrécis que l'on peut coucher hori-

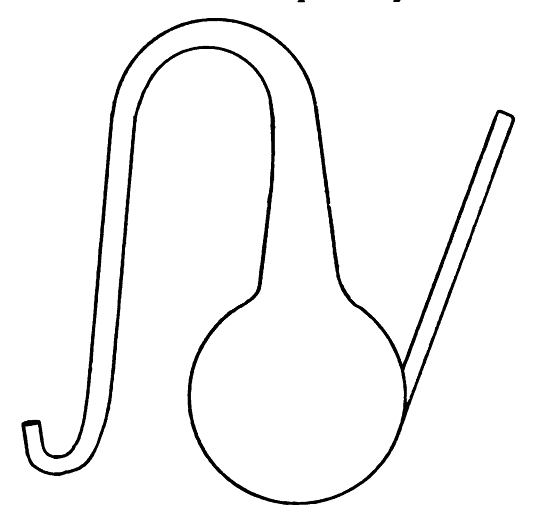


FIG. 8. — Ballon à col de cygne de Pasteur.

zontalement, et où l'on étale la gélatine, ou bien on

emploie les plaques de verre ordinaire, les boîtes de Pétri (fig. 9) que l'on peut observer directement au microscope pour faire les numérations de microbes. Elles sont composées de 2 cristallisoirs formant boîte et dont le fond est bien dressé. On emploie aussi les chambres humides dans lesquelles la culture progresse tout en étant observable au microscope.

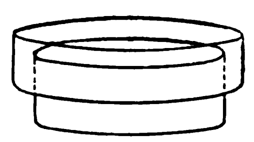


Fig. 9. — Boîte de Pétri.

Il y a deux sortes de chambres humides, les unes (fig. 10) sont formées d'un anneau de verre soudé sur une lamelle de microscope, les autres sont formées (fig. 11) d'une cuvette

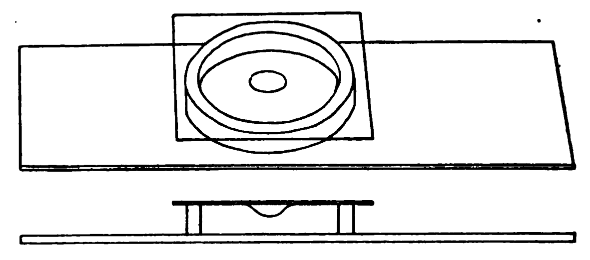


Fig. 10. — Chambre humide.

creusée dans une lamelle; cette cuvette est souvent entourée d'une rigolle plus profonde où l'on met de la vaseline.

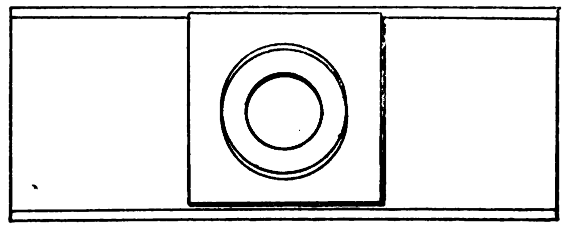


Fig. 11 — Chambre humide.

La cavité de la chambre humide est remplie par une

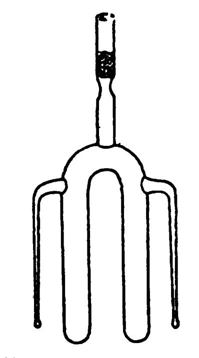


Fig. 12. — Tube pour culture anaérobie de Pasteur.

goutte d'eau, elle est recouverte d'une lamelle couvre-objet portant la goutte de culture.

La chambre est enfermée dans une cloche humide.

Cultures anaérobies. — Très souvent on les fait dans les appareils précédents en ensemençant profondément.

Mais il y a un certain nombre d'appareils spéciaux, qui ont sur les précédents deux avantages : ils offrent d'abord un milieu plus désoxygéné et ensuite la non-nécessité de casser l'appareil pour faire

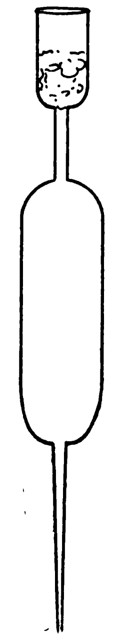


Fig. 13. — Tube effilé pour culture anaérobie sur milieu solide.

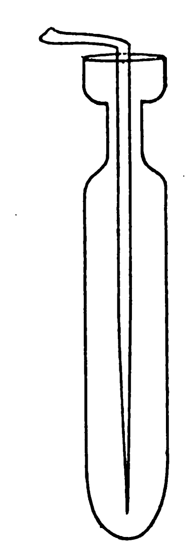


Fig. 14. — Tube à essai avec tube amenant un gaz inerte pour culture anaérobie.

nement qu'après 3 ou 4 cultures, une goutte prélevée dans la dernière aura des chances d'être exclusivement composée de levure. Ce n'est pas fatal et il faudra toujours vérifier que la culture ensemencée par cette dernière goutte est une culture pure de la seule espèce désirée.

Pasteur a employé cette méthode pour purifier de la levure de bière. Celle-ci était lavée plusieurs fois avec de l'eau sucrée diluée à 10 pour 100, puis traitée par la méthode.

Deuxième méthode. — *Basée sur l'influence de la température sur les différentes espèces.*

Dans l'urine il existe un certain nombre de microbes décomposant l'urée. Il y en a deux importants : l'un qui est un bacille et l'autre un micrococcus.

Le premier résiste à 80°, le second ne résiste pas. De là un moyen de séparer le premier.

Troisième méthode. — *Méthode des gouttelettes diluées.*

Je suppose qu'on ait un bouillon de culture contenant plusieurs microbes. Si le bouillon est très concentré, on trouvera toutes les espèces dans une goutte. Mais quand le bouillon est assez dilué pour qu'en général une goutte ne contienne qu'un microbe, on a, en ensemençant avec une seule goutte, des chances d'avoir une culture pure d'une seule espèce. Mais il faut vérifier le résultat car il peut se faire qu'une goutte même diluée contienne 2, 3 microbes.

La méthode a été complétée par Lindner. Il peut arriver que la goutte contienne par exemple deux microbes. Mettons-la sur un milieu solide, tel qu'une plaque à base de gélatine. Par suite de l'étalement de la goutte, les microbes vont être déposés en des points différents et comme leur déplacement propre s'ils sont mobiles, ou mécanique s'ils ne le sont pas, se trouve gêné, ils resteront isolés, se multiplieront chacun à leur place et fourniront des colonies qui, au début, ne seront pas mé-

langées. En se servant de celles-ci pour un ensemencement ultérieur on aura séparé les espèces (1).

Cette méthode a été encore améliorée. On emploie des milieux pouvant être solides ou liquides à volonté. On ensemence dans un de ces bouillons et on agite.

Les différents microbes se trouvent espacés. Cela fait, on répand le milieu liquide sur une plaque de verre et on le laisse se figer de sorte que les microbes sont emprisonnés en des points différents. On s'arrange ordinairement de manière que ces plaques de verre soient telles qu'on puisse les regarder directement au microscope.

D'autres fois, au lieu de répandre la culture sur une grande plaque, on la répand sur un couvre-objet de microscope et une fois la culture figée on place le couvre-objet sur une lamelle de microscope creusée d'une cuvette contenant une goutte d'eau. La culture se trouve ainsi enfermée dans un milieu humide et peut se développer. On n'a qu'à l'observer de temps en temps. Hansen emploie des gouttes qui à la température de culture redeviennent liquides, l'adhérence suffisant pour les empêcher de tomber.

Dans ce cas, lorsqu'on veut observer la culture, on retire la chambre humide de l'étuve, on la laisse figer et on observe directement au microscope.

Méthodes de stérilisation.

Avant de faire une culture il faut stériliser les vases où doit se faire cette culture.

---

(1) Il faut remarquer que les cultures sur gélatine imposent souvent aux microbes des formes spéciales ; les mycélium poussant par les extrémités, à cause de la résistance éprouvée tendront à donner des ramifications rectilignes; tandis que les bacilles qui s'allongent sur toute leur longueur

Les méthodes sont peu nombreuses. Les unes sont basées sur l'emploi de la chaleur, les autres sur celle des filtrations.

Chaleur sèche. — On peut employer la *chaleur sèche*. Pour l'air, le passage dans un tube rouge est ce qu'il y a de mieux. Pour un petit objet comme un fil de platine on se contente de le passer dans une flamme de bec Bunsen ou de lampe à alcool.

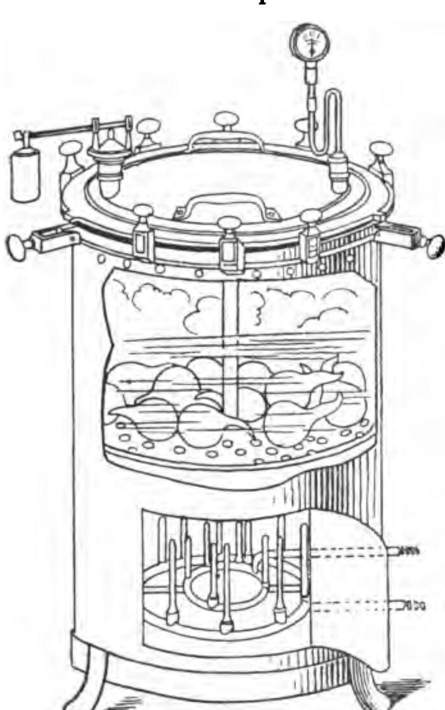


Fig. 1. — Autoclave Chamberland.

Pour un grand objet on le met dans un four à flamber. C'est un appareil à double paroi chauffé par les gaz chauds d'un réchaud à gaz et où l'on peut porter les appareils à 120°. Chaque fois qu'on veut stériliser un vase ouvert il faut avoir soin de le fermer avec un tampon de coton pour empêcher au refroidissement l'air de ramener des microbes.

Chaleur humide. — On peut employer la *chaleur humide* et chauffer les appareils sous pression dans des autoclaves contenant de l'eau (fig. 1). On peut aussi employer la méthode de Tyndall.

---

tendront à se courber et que les cellules plus ou moins rondes et bourgeonnantes telles que les levures formeront des colonies circulaires denses.

Suivant la nature du liquide on chauffe de 58° à 100°. En général la plupart des microbes sont tués, mais les spores peuvent résister, de sorte que le lendemain le milieu est de nouveau infecté.

On chauffe de même les 2e, 3e, 4e jours. Au bout de ce temps l'appareil est en géneral stérilisé. Néanmoins avant de s'en servir il faut en faire la vérification.

Filtration. — Quant à la filtration on peut la faire dans des bougies de dégourdi de porcelaine ou d'amiante ou dans des vases de matières analogues et de forme sphérique. Ceux-ci sont moins bons que les premiers, ayant moins de surface. On fait traverser les liquides soit de l'intérieur à l'extérieur ou inversement, la 2e méthode valant mieux à cause du nettoyage. On emploie soit la pression sur le liquide à filtrer, soit le vide sur le liquide filtré qui doit toujours être recueilli dans un vase stérilisé.

On peut aussi filtrer à travers une sorte de tripoli le Kieselguhr que l'on calcine et que l'on emploie comme le noir.

Vases à cultures.

Il y a lieu de distinguer entre les cultures aérobies et les anaérobies.

Vases à cultures aérobies. — Pour faire les cultures aérobies on se sert d'un certain nombre de vases différents.

Les uns sont des appareils ouverts qu'on ferme par un tampon de coton : tels sont les tubes à essai, les vases coniques, les tubes à essai étranglés vers le bas pour la culture sur pomme de terre, les simples matras à bords rodés, les matras Fernbach disposés pour faire circuler de l'air au-dessus de la couche de liquide (fig. 2, 3, 4, 5).

D'autres sont fermés par un bouchon extérieur portant un tube étroit pour le dégagement des gaz ; ce tube est

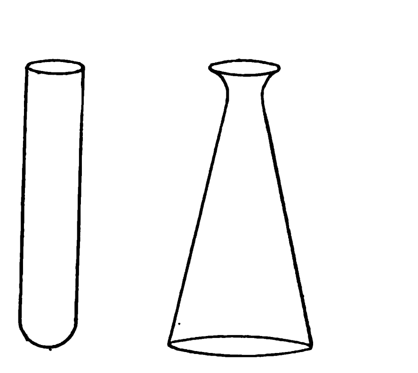


Fig. 2. — Tube à essai. Vase conique.

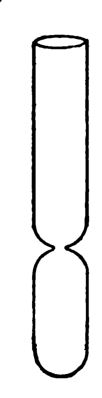


Fig. 3. — Tube à culture sur pomme de terre.

lui-même obturé par un petit tampon de coton : tels sont les matras de Chamberland (fig. 6) et de Hansen (fig. 7).

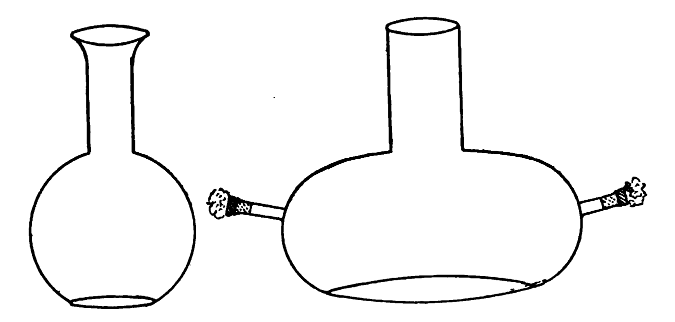


Fig. 4. — Matras ordinaire rodé.

Fig. 5. — Vase Fernbach.

Lorsqu'on doit étudier les gaz dégagés, on emploie le ballon à col de cygne de Pasteur ; une tubulure latérale permet l'ensemencement ; elle est fermée par un bout de

Milieu pour cultures anaérobies.

Lorsqu'on doit faire une culture anaérobie dans un tube ordinaire on emploie quelquefois un bouillon gélatiné où l'on incorpore 1/1000 d'un mélange d'indigo réduit par de la soude et de la glucose. L'indigo se réoxyde aux dépens du bouillon qui perd dès lors son oxygène. De plus on protège la culture par une couche de pétrole.

Ayant décrit la composition des différents milieux de culture, il nous reste à indiquer les méthodes d'ensemencement.

Méthodes d'ensemencement.

Milieux liquides.

Par exemple, nous avons dans un matras un microbe que nous voulons ensemencer dans un deuxième matras. L'opération se fait de la manière suivante : on débouche le flacon dans lequel on doit prendre la gouttelette à ensemencer et avec une baguette de verre portant un fil de platine recourbé en boucle et préalablement flambé on prélève une gouttelette en observant la règle suivante : chaque fois qu'on ouvre le vase de culture on passe le bouchon à la flamme. On fait de même chaque fois qu'on le ferme. On évite ainsi d'introduire des microbes qui auraient pu s'attacher au bouchon pendant le temps qu'il est resté à l'air.

Pour introduire la gouttelette ainsi prélevée dans le vase de culture vierge, on fait la même opération avec le second flacon.

L'opération terminée on flambe de nouveau le fil de platine.

Quand on doit ensemencer plus fort on se sert d'une pipette flambée, fermée du côté de l'aspiration par un tampon de coton et de l'autre côté par fusion de la pointe (fig. 18).

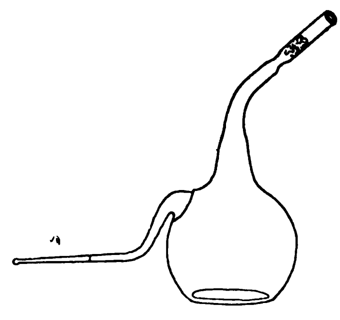


FIG. 18. — Pipette Pasteur.

Lorsqu'on doit se servir de cette pipette, on casse la pointe, on la flambe, on prélève du liquide à ensemencer et on fait couler la quantité convenable dans les vases de culture en ayant soin chaque fois de flamber la pointe.

Pour éviter les infections inutiles, la panse de la pipette a une partie plate sur laquelle elle se tient d'aplomb, la pointe étant alors un peu dirigée en l'air.

Milieux solides.

Prélèvement de la semence. — Voyons d'abord comment on prélève la semence.

S'il s'agit de prélever une semence liquide on procède comme plus haut, mais sans faire de boucle au fil de platine. S'il s'agit de prélever la semence dans un tube garni de gélatine, on opère ainsi : on retourne le tube, on le débouche, et on introduit le fil de platine. Cela fait, on laisse descendre le tube de manière que le fil pénètre dans la gelée ; puis au contraire on laisse tomber le fil de manière qu'il se dégage. On le sort et on referme le tube avec le tampon de coton préalablement flambé.

S'il s'agit de prélever la semence sur une plaque, on racle une des colonies avec un fil ou une anse de platine.

Ensemencement. — Une fois la semence prélevée, s'il s'agit d'une culture aérobie, on égratignera le nouveau

milieu avec le fil chargé de semence ; on fait plusieurs égratignures parallèles. S'il s'agit d'une culture anaérobie on enfonce le plus possible le fil de platine.

Lorsque l'on doit faire des cultures sur plaques ou en boîte de Pétri on opère de la manière suivante :

On fait l'ensemencement dans un tube de gélatine encore fondue (à 30°-35°), on l'agite et on en coule le contenu sur plaque de verre ou dans une boîte de Pétri, préalablement flambées ; dans ce dernier cas, on soulève un instant le couvercle, qu'on laisse retomber immédiatement, puis on étale la couche sur le fond et on refroidit la boîte en la plaçant au besoin sur la glace.

Lorsque l'on doit charger des chambres humides, on ensemence un ballon de gélatine encore chaude, puis on prélève des gouttes qu'on reporte sur les couvre-objets qui doivent fermer les cuvettes des chambres humides.

Lorsqu'on doit charger un tube à essai, à ouverture rétrécie, on l'ensemence à l'état liquide, on le pose horizontalement et on le roule pour étaler la gélatine.

Étuves. — Les milieux ensemencés ne fermentent qu'à certaines températures ; d'où la nécessité d'étuves réglables.

Ordinairement on a deux étuves, une réglée à 35° pour les cultures ordinaires ; l'autre réglée à 22° pour les cultures en moûts gélatinés devant rester solides.

Ces étuves doivent avoir un régulateur suffisamment parfait.

Régulateur Raulin. — On peut employer une étuve de Gay-Lussac en y adaptant le régulateur Raulin (fig. 19).

Celui-ci est constitué par une poche de fer pleine de mercure.

Cette poche est plongée dans l'étuve.

A sa partie supérieure, circulairement, une fente sert à l'introduction du gaz. La région de la fente est entou-

rée d'une partie conique reliée à une tubulure qui sert à l'arrivée du gaz.

Celui-ci pénètre par la fente dans la poche et sort de celle-ci par une tubulure supérieure.

Le système fonctionne en régulateur parce que plongé dans l'étuve à température trop élevée le mercure est suffisamment dilaté pour boucher la fente d'admission.

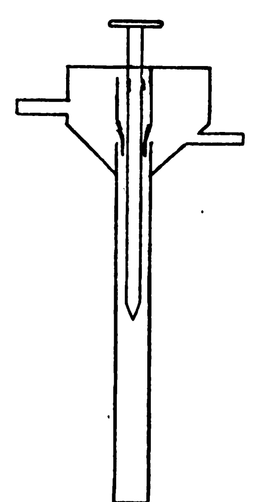


Fig. 19. — Schéma du régulateur de Raulin.

Si donc la température est trop basse la fente est ouverte et le gaz circule ; si la température est trop haute, la fente est fermée, le gaz s'arrête, l'étuve se refroidit, le mercure baisse, la fente se rouvre, le gaz circule à nouveau et se rallume à une veilleuse.

Toute la question est d'amener le mercure au niveau convenable. On peut le soulever plus ou moins en enfonçant plus ou moins dans la poche une tige de fer. Plus celle-ci plonge, plus l'appareil fonctionnera à basse température. Pour régler l'appareil on attend que la température désirée soit atteinte, et on enfonce progressivement la pointe jusqu'à arrêt du gaz. On fixe alors la pointe à cette position par un collier à vis de serrage.

Remarque : La veilleuse est alimentée par une dérivation du gaz évitant le régulateur.

Étuve d'Arsonval. — Dans l'étuve d'Arsonval le régulateur est différent. L'étuve est une boîte à double paroi chauffée par un liquide. Il y a sur la paroi extérieure un trou sur lequel on peut fixer une lame élastique qui, à l'extension par un jeu de leviers, peut arrêter le débit du gaz dans l'appareil de chauffage. Comment se fait le

réglage primitif ? On ôte la lame, on chauffe l'appareil et lorsque la température voulue est obtenue on pose la lame. La lame ainsi ajustée ne peut jouer que lorsque la température devient plus grande que la température désirée.

Pasteur employait une étuve chauffée par la circulation d'un courant d'eau. Il fallait y adjoindre une chaudière à eau et un condensateur. Quant au réglage proprement dit il s'obtenait par tâtonnement. Cet appareil a d'ailleurs le défaut d'être compliqué.

Étuve Roux. — On emploie aujourd'hui l'étuve de Roux (fig. 20) chauffée par une circulation d'air chaud dans un système tubulaire. Le foyer est une rampe de gaz. Il suffit pour régler l'appareil de régler l'arrivée du gaz. Pour cela à l'intérieur de l'étuve est une sorte d'U formé de deux lames de dilatabilités très différentes (fer et zinc) soudées entre elles et recourbées en U, le zinc à l'extérieur.

Quand la température s'élève, l'ouverture de l'U diminue et on utilise le jeu d'une des branches par rapport à l'autre pour déplacer un petit piston qui ferme l'admission du gaz dans l'appareil.

Coloration des microbes. — En microbiologie générale on emploie souvent la méthode des colorants pour distinguer certaines espèces. En ce qui concerne les microbes relatifs à la distillerie, cette méthode est fort peu employée, nous n'en dirons qu'un mot.

La teinture par un colorant est le résultat d'une coagulation de la matière tinctoriale par le corps à teindre, naturel ou, comme on dit, mordancé, c'est-à-dire déjà recouvert d'un autre coagulum. Le résultat obtenu dépend de la présence des corps étrangers qui peuvent empêcher ou détruire la coagulation cherchée.

Actuellement, les matières colorantes employées sont des couleurs d'aniline basiques, telles par exemple que la

fuchsine; les matières acides teignent en général indifféremment tout, ce qui en rend l'usage vain et inutile. On prépare ordinairement les couleurs à 1 pour 100 en

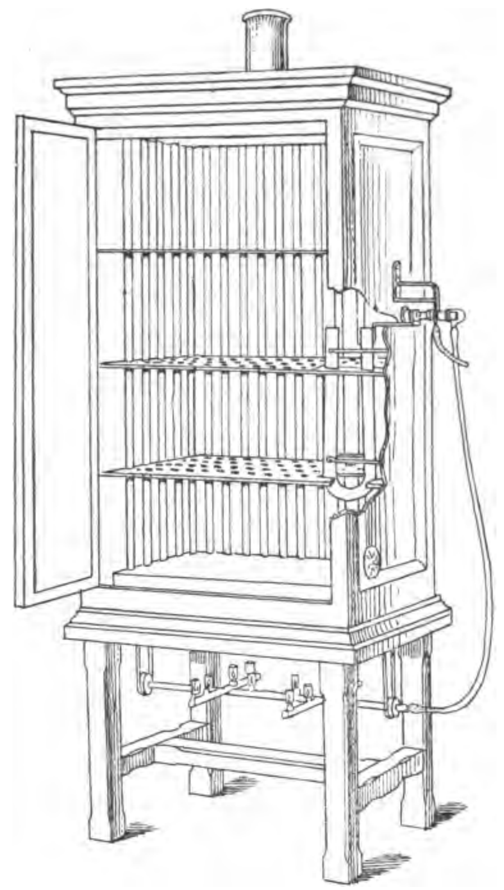


Fig. 20. — Etuve Roux.

solution alcoolique, ou plutôt à 10 pour 100, mais on les dilue au 1/10 avec de l'eau au moment de l'emploi.

On se sert surtout comme mordant de phénol, d'aniline, de potasse.

Manuel opératoire. — Pour colorer une préparation, on en met une goutte sur un couvre-objet, on passe 3 fois au-dessus d'une flamme pour sécher, on pose une goutte de teinture, et on lave à l'eau distillée dans un petit cristallisoir. On vérifie la préparation, si elle est convenable on la lave avec quelques gouttes de xylol, on y pose une goutte de baume de Canada et on renverse le couvre-objet sur une lamelle.

On doit observer au microscope les préparations colorées avec un diaphragme plus ouvert que les préparations non colorées.

Formules de teintures. — Nous citerons parmi les nombreuses formules de teintures les suivantes :

Réactif de Ziehl. — Fuchsine.. . . 1 gr.
Eau. 95
Phénol. . . . 5

Réactif au violet de gentiane.
Violet de gentiane. . . . 2,5 gr.
Eau. 100
Solution d'alun à 10 p. 100. XXII gouttes.

Ces deux colorants rendent bleu sombre un grand nombre de microbes (en particulier la levure).

Réactif de Lintner. — Bleu soluble. . . 10 gr.
Eau. 100
Potasse au 1/1000. 2

Réactif au bleu d'indigo. — On broie 2 grammes d'indigo dans 4 grammes d'acide sulfurique concentré ; on laisse déposer un jour, on ajoute 25 volumes d'eau, on chauffe à 40°, on neutralise incomplètement à la craie, on décante, on achève de neutraliser au carbonate de soude.

Ces 2 réactifs servent à caractériser les levures mor-

tes, on laisse tomber une goutte de la liqueur à étudier dans l'un des deux réactifs ; après quelques instants, on étend avec de l'eau sucrée, on pose une goutte sur un couvre-objet, qu'on applique ensuite sur une lamelle. On observe au microscope, les levures mortes sont seules teintes en bleu par le bleu, en bleu violet par l'indigo.

Réactifs de Gram. — On peut encore se faire une idée de la vitalité d'une culture à l'aide des préparations de Gram :

1re solution. — On dissout 5 centimètres cubes d'aniline dans 100 d'eau, on agite et on ajoute 10 centimètres cubes de solution alcoolique concentrée de violet de méthyle et 10 centimètres cubes d'alcool absolu ;

2e solution. — Iode 0,5 gr. ; iodure de potassium 5 gr. ; eau 150 cc ;

3e solution. — Solution alcoolique d'éosine 20 grammes ; 40 gouttes d'huile de girofle.

On flambe, on plonge 2 minutes dans le n° 1, on lave à l'alcool, on plonge 2 minutes dans le n° 2, on lave à l'alcool, on plonge 10 minutes dans le n° 3.

Les cellules fraîches sont bleu foncé, les cellules malades sont violettes, les cellules mortes sont roses.

Différenciation des organes. — Il est bon de pouvoir caractériser les différentes régions des microbes.

Membranes. — On ne peut pas caractériser la *membrane* des levures par les réactifs de la cellulose (iode et acide sulfurique ; iode et chlorure de zinc).

Noyaux. — Pour mettre en évidence les *noyaux*, on dispose des réactifs suivants :

Réactif au vert méthyle. — La solution aqueuse additionnée de 1 pour 100 d'acide acétique colore exclusivement les noyaux en bleu vert.

Réactif à l'hématoxyline. — Hématoxyline $0^{gr},35$, eau 10, solution d'alun à 10 pour 100, 40 gouttes.

Colore les noyaux en bleu, il faut prolonger l'action.

Un autre mode d'emploi de l'hématoxyline est celui-ci : on mordance en trempant pendant 4 heures dans une solution d'alun à 25 pour 100, puis on colore pendant 12-18 heures avec une solution d'hématoxyline à 0,5 pour 100.

On lave ; les noyaux apparaissent en noir, le plasma à peine en violet.

Réactif au carmin. — Celui-ci dissous dans l'ammoniaque, chauffé, additionné d'eau, d'alcool et de glycérine, colore les noyaux en rouge.

Spores. — Pour mettre en évidence les *spores*, il faut les rendre pénétrables aux colorants en les maintenant de 15 à 30 minutes à 200° ; la comparaison de cette préparation avec la préparation habituelle indique les spores.

Une autre méthode consiste à laisser la préparation pendant 30 minutes sur un bain de fuschsine à 80°, on lave ensuite avec de l'alcool à 60° additionné d'un peu d'acide chlorhydrique, on lave à l'eau, on plonge dans un bain de bleu de méthylène (bleu de Lintner) ; on décolore à l'alcool et l'on aperçoit les spores en rose, les cellules en bleu.

Gouttelettes huileuses. — Pour mettre en évidence les *gouttes d'huile*, on fait agir l'acide sulfurique qui produit des taches variant d'un gris verdâtre à un brun noirâtre.

Cils. — Enfin on peut mettre en évidence les *cils* de certaines bactéries en les mordançant avec une solution formée de 10 centimètres cubes de tanin à 20 pour 100 et de 1 centimètre cube de solution alcoolique de fuchsine ; on sèche, on traite par une solution de fuchsine aniline (fuchsine 1, eau 95, aniline 5) additionnée de quelques gouttes de soude.

Les cils sont alors colorés et visibles, probablement parce que les mordants en augmentent le volume.

ÉTUDE SPÉCIALE DES DIFFÉRENTS MICROBES

Nous venons d'indiquer les méthodes de séparation des microbes. Supposons qu'elles aient été appliquées à la séparation des espèces qu'une distillerie peut contenir et décrivons ces espèces.

Quoique spéciales au sujet qui nous occupe, elles sont cependant en très grand nombre et pour mettre de l'ordre nous suivrons dans leur étude la classification de la botanique générale.

L'ensemble du règne végétal comporte :

1) Les plantes à racines et vaisseaux comprenant :	Les plantes à fleurs (phanérogames). Les plantes sans fleurs (cryptogames vasculaires).
2) Les plantes sans racines et sans fleurs, comprenant :	Les plantes ayant des feuilles (mucédinées). Les plantes sans feuilles (thallophytes).

Les plantes dont nous avons à parler se rattachent à ce dernier groupe.

CLASSIFICATION DES THALLOPHYTES

Les plantes sont réduites à un organe unique qui n'est pas différencié et désigné sous le nom de thalle.

L'embranchement des thallophytes est divisé en deux classes.

Certaines plantes sont parasites, incapables de produire par elles-mêmes les éléments qui vont les consti-

tuer, autrement dit elles ne contiennent pas de chlorophyle; ces plantes ne se reproduisent pas par scissiparité. C'est la classe des champignons dont le thalle comporte souvent des filaments ramifiés. L'ensemble de ces filaments est dit le mycelium; les filaments sont désignés sous le nom d'hyphes.

Beaucoup des microbes qui nous intéressent appartiennent à cette classe ; ainsi les levures sont des champignons.

D'autres plantes *peuvent* ne pas être parasites, elles contiennent souvent soit de la chlorophyle, soit des pigments jouant le même rôle.

Beaucoup se reproduisent par scissiparité. Elles constituent la classe des algues.

Les bactériacées sont des algues qui sont parasites et qui se reproduisent par scissiparité.

Classification des champignons.

La classe des champignons comprend 4 ordres.

Il y a des champignons qui n'ont pas de membrane extérieure et qui sont réduits au protoplasma ; à cause de cela, ils paraissent mobiles, ont l'aspect de gelée. Ce sont les champignons de l'ordre des *Myxomycètes*.

D'autres ont une membrane, ils ne paraissent donc pas mobiles. Parmi eux, il en est qui sont formés pour ainsi dire d'une seule cellule, sans aucun cloisonnement intérieur. Ces champignons se reproduisent par *œufs* et par *spores*. Ce sont les champignons de l'ordre des *Oomycètes*.

Parmi les champignons pourvus de membrane il en est qui ont des cloisonnements intérieurs, qui ne se reproduisent pas par œufs, qui ont d'autres moyens de reproductions, parmi lesquels se trouve la sporulation.

Ce groupe se subdivise en deux ordres :

Dans le premier, les spores se produisent extérieurement sur des organes particuliers appelés Basides. C'est l'ordre des *Basidomycètes*.

Dans l'autre ordre, les spores se produisent à l'intérieur d'une cellule particulière nommée asque. C'est l'ordre des *Ascomycètes*.

Dans chacun de ces ordres nous allons trouver des individus intéressants pour nous.

Premier ordre. Myxomycètes.

Dans ce groupe, il y a peu d'individus nous intéressant. Une seule espèce nous regarde; c'est la *fleur de tan* (physare leucope), sorte de gelée blanche qui se trouve sur la tannée. Elle nous intéresse parce qu'elle peut détruire les appareils en bois.

Deuxième ordre. Oomycètes.

Ces champignons se reproduisent par œufs et par spores. Voyons comment se fait cette reproduction. Avant la mauvaise saison elle se fait par œufs. A un certain moment, de l'intérieur du bouillon de culture partent deux rameaux d'abord divergents, puis se recourbant pour devenir convergents. Les extrémités de ces rameaux se cloisonnent et forment deux cellules qui se rapprochent, viennent au contact, fusionnent et forment ainsi l'œuf qui reste en place.

Dans le courant de la belle saison, la reproduction se fait par spores. A l'extérieur du liquide, on voit un rameau se gonfler, se cloisonner et former une nouvelle cellule, la *sporange*. — Celle-ci se cloisonne à son tour,

s'allourdit de telle sorte que le rameau s'incline et tombe dans le liquide ; l'extérieur de la sporange se dissout et met en liberté les cellules intérieures. Ce sont les spores qui vont à leur tour bourgeonner, produire des rameaux, etc...

Ce groupe comporte un certain nombre de plantes importantes.

Genre Mucor. — Dans le genre Mucor, on trouve un certain nombre de plantes qui peuvent jouer un rôle en distillerie. Ce sont les :

Mucor mucedo. — Regardé au microscope, (fig. 21 et 22) il a l'aspect d'une plante garnie de nombreuses racines, supportant des tiges fructifères. On le trouve dans les moûts de bière et de raisin et sur le raisin lui-même. On le cultive très bien sur le crottin de cheval à 35° ou sur le pain acidulé d'acide tartrique. Les sporanges sont brunes ou noires, à membranes lisses ou garnies de pointements serrés d'oxalate de chaux. Les spores sont à membrane incolore enveloppant un contenu jaune ; leurs dimensions sont de 7-11/4-6 μ.

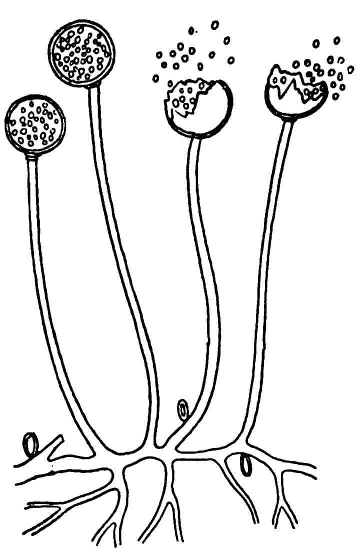


FIG. 21. — Mucor mucedo. D'après Guichard.

Mucor racemosus. — Il est plus ramifié que le précédent (fig. 23). Il a tout à fait l'aspect d'une branche de corail. Il vit sur le raisin et le moût de bière. Les sporanges sont globuleuses, jaune clair de 30-34 μ ; les spores elliptiques ou sphériques sont incolores de 5-8/4-5 μ. Sur les vieux myceliums

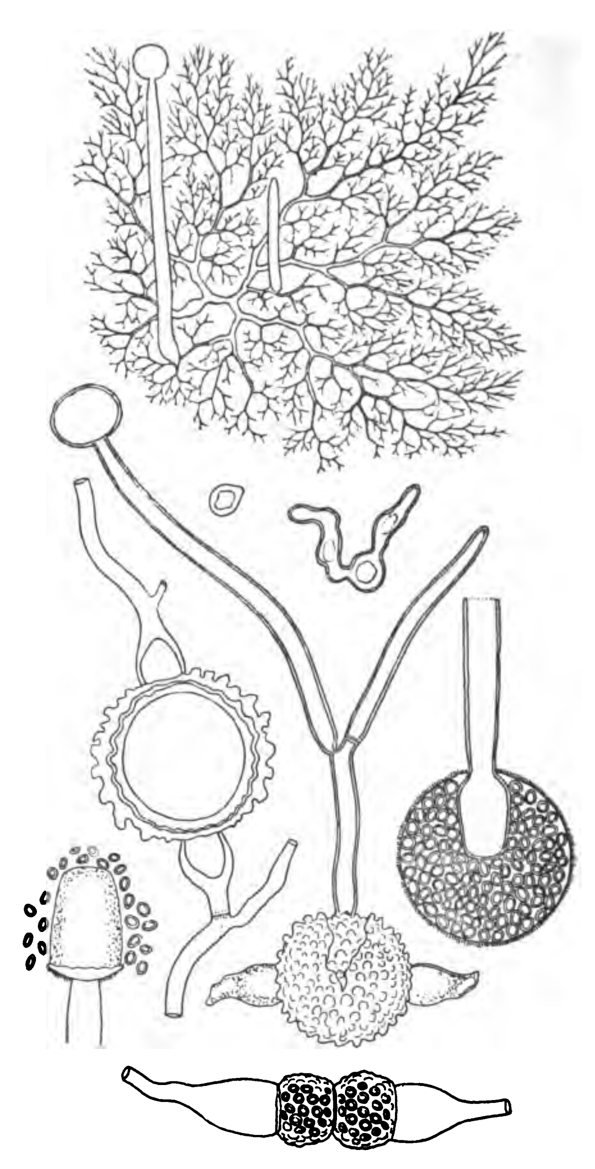


Fig. 22. — Mucor Mucedo.
D'après Duclaux.

on trouve des bourgeons intercalaires ou terminaux qui,

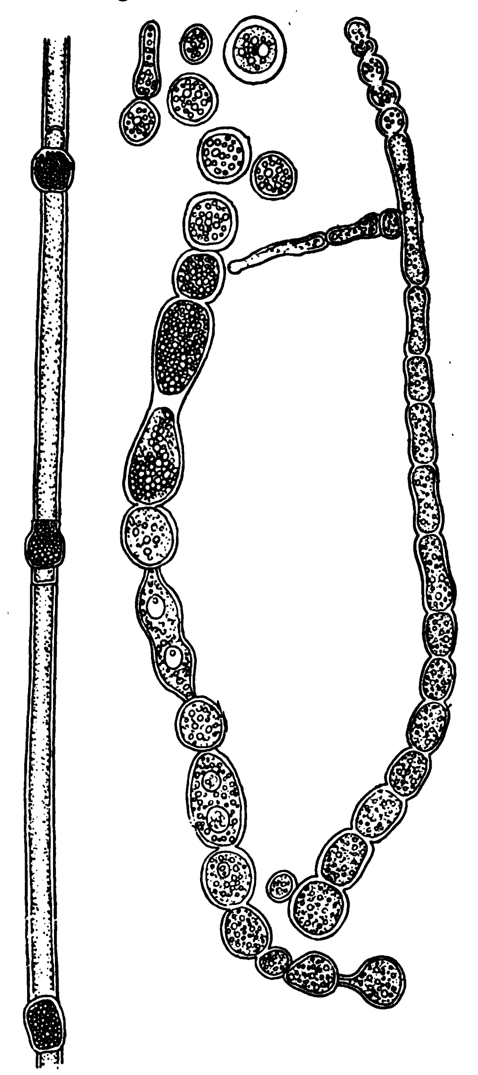


Fig. 23. — Mucor racemosus.
D'après Guichard.

à l'air humide, donnent de petits tubes sporangifères.

Mucor spinosus. — Ne diffère du précédent (fig. 24) que

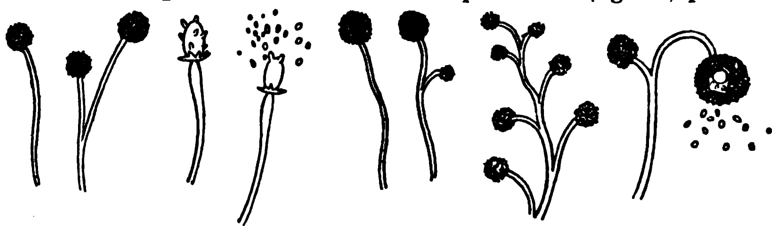


Fig. 24. — Mucor spinosus. D'après Guichard.

Fig. 25. — Mucor circinelloïdes. D'après Guichard.

par les spores garnies de piquants. Elles sont couleur chocolat.

Mucor circinelloïdes. — Il vit ordinairement sur le moût de bière. Il présente (fig. 25 et 26) une particularité relative à la manière de former les spores. Soit un rameau ayant donné une spore. Immédiatement après, pousse en dessous de la spore qui vient de naître un rameau secondaire qui va produire à son tour une spore et ainsi de suite, de sorte que la disposition des spores est curviligne. Les spores sont d'ailleurs grises.

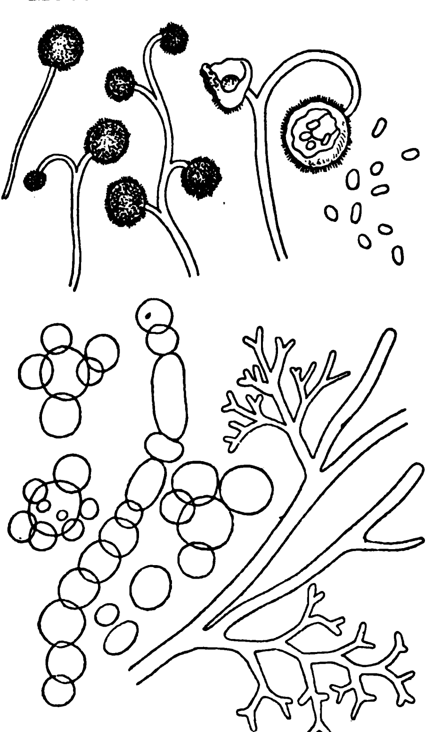


Fig. 26. — Mucor circinelloïdes. D'après Guichard.

Mucor erectus. — Est très voisin morphologiquement.

Mucor piriformis. — Il vit sur la poire, la pomme. Il a été l'objet d'études récentes ; il sert à la fabrication de l'acide citrique.

Mucor stolonifer (appelé souvent Rhizopus Nigricans) est formé de tubes bruns simples, arqués (Stolons), souvent fort longs (1 centimètre). Ils poussent obliquement par rapport au substratum; à leur extrémité inclinée naissent quelques rameaux en rosettes, sorte de crampons qui s'attachent aux supports ; à côté de ces rosettes se produisent un ou deux tubes sporangifères, et un ou deux stolons. Les sporanges sont noires, véruqueuses ; les spores sont sphériques, brunes ($D = 10\ \mu$).

Genre Peronospora. — Représenté par le peronospora de la vigne cause du mildew et par le peronospora de la pomme de terre ; il constitue un genre voisin des mucors, mais les éléments mâle et femelle sont portés par des individus différents.

Genre monas. — C'est un genre intermédiaire entre les Oomycètes et les Myxomycètes, car, tant que la plante n'est pas fixée sur le support nourricier, elle n'a pas de membrane. C'est une cellule qui produit des spores mobiles ou zoospores ciliées; dans le monas lens qui nous intéresse il y a deux cils; les spores sortent de la cellule même, les cils se résorbent, les zoospores se déplacent et vont se fixer sur un support.

Troisième ordre. Basidomycètes.

Les plantes de cet ordre sont très nombreuses. Nous en étudierons deux familles qui nous intéressent particulièrement et qui forment dans l'ordre des groupes un peu à part.

Nous y rattacherons une moisissure, le fusarium hordei, qui se rapproche plus de l'ordre des Basidomycètes que de tous les autres.

Famille des urédinées. — Ce sont les plantes de cette famille qui causent la rouille des céréales, maladie de certaines de nos matières premières. Les spores de ces plantes ont des propriétés diastasiques très puissantes qui les font employer à la place du malt. Dans cette famille la reproduction se fait de deux manières : par spores naissant d'une cellule spéciale ou *baside* et par bourgeonnements qui se font à même le thalle (*Conidies*).

La conidie est une parente plus rapprochée de la plante que la spore. La conidie est l'organe de reproduction pendant la belle saison et la spore, qui résiste à l'hiver, reproduit l'espèce au printemps.

A l'époque de l'hivernation, la plante bourgeonne une dernière fois ; le bourgeon ne doit pas être considéré comme une conidie car l'hiver commence et il ne peut se développer. Il reste en place. On lui a donné le nom de probaside. Au printemps (1), cette probaside, qui n'a pas germé pendant l'hiver, bourgeonne et donne un bourgeon qui est la baside. Cette baside se fractionne en un certain nombre de cellules. De chacune de ces cellules part un tube qui se termine par un renflement. Ce sont les spores.

Les spores emportées par le vent vont s'implanter sur l'Épine-vinette (Berberis) lorsqu'il s'agit de la rouille des céréales vulgaires (2).

Elles y végètent, se ramifient et donnent des conidies qui sont rouges. Ces conidies se détachent à leur tour et

---

(1) Donc les pailles rouillées conservées en meules ne sont pas une cause de contagion ; de plus la faculté germinative ne dure guère qu'une saison, donc les pailles des années antérieures ne sont pas non plus dangereuses.

(2) D'après Erikson, il y a 30 espèces causant la rouille ; il pense que l'hypothèse du transport par le vent est inutile. Car des tiges isolées dans des tubes de verre ont été rouillées. L'auteur pense qu'un élément tel que la probaside passe l'hiver à même les grains.

vont retomber sur les céréales, s'y développent en insinuant leur myceliums entre les cellules, disloquent les tissus, redonnent des conidies rouges, cause de l'aspect des céréales rouillées.

Famille des ustilaginées. — Elle est voisine de la précédente, elle comporte les plantes cause de la carie des céréales. Nous citerons les ustilago, les titletia.

Fusarium hordei. — On peut rattacher aux basidomycètes une moisissure qui se rapproche de ce groupe plus que de tout autre. C'est le Fusarium Hordei.

Sur les grains de malt on trouve souvent une moisissure rouge dont les cultures sur bouillon sentent le moisi et dont les spores sont rouges.

Les spores sont en forme de faulx; si on ensemence avec elles un bouillon, après 3 ou 4 jours elles se cloisonnent; puis des cellules non terminales poussent des tubes myceliens (ce cloisonnement correspond à la formation de conidies). Ce qui est remarquable c'est que les tubes des différentes spores s'anastomosent de sorte que la culture ne forme qu'un vaste réseau.

Les spores se produisent de la manière suivante : une excroissance papillaire se forme sur un tube mycélien et celle-ci donne un bourgeon en forme de faulx. C'est une spore qui ne tarde pas à se détacher et qui est remplacée par une autre.

De sorte que plus tard on trouve au fond de la culture une couche de spores jeunes et vieilles.

Cette moisissure n'est pas une myxomycète ni une oomycète, car elle a une membrane et est cloisonnée. Elle n'est pas non plus une ascomycète, puisque les spores sont externes, elle est donc plutôt à classer parmi les basydomycètes.

Quatrième ordre. Ascomycètes.

Nous le subdiviserons en trois groupes, dont les 2 premiers comportent des moisissures qui n'appartiennent pas aux ordres précédents, mais se distinguent assez des ascomycètes pour ne pas être confondus avec eux.

Premier groupe : Pseudoascomycètes.
Deuxième groupe : Dématium.
Troisième groupe : Ascomycètes proprement dits.

1° ***Pseudoascomycètes.*** — Dans ce groupe se trouve l'amylomyces qui sert en Chine à faire de l'alcool à l'aide du riz. Les cultures de cette plante ont les aspects suivants (fig. 27-28-29) :

Sur agar-agar glucosé, développement rapide d'un voile.

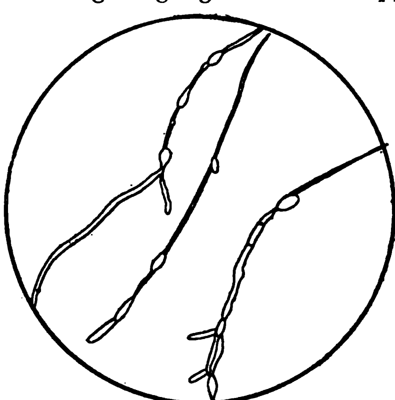


Fig. 27. — Amylomyces Rouxii. D'après les annales de la brasserie et de la distillerie.

Sur pomme de terre, léger enduit farineux qui devient transparent.

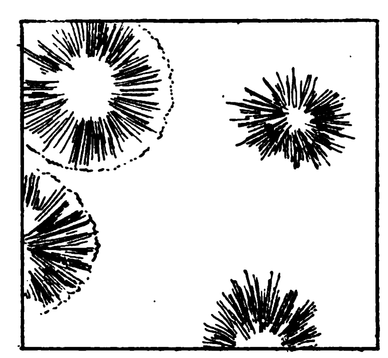
Les moûts de bière, les moûts amylacés et les moûts contenant du phosphate de potasse lui conviennent très bien.

Elle coagule le lait en le rendant acide. Voyons comment cette plante se développe.

Supposons qu'on ait soit une spore, soit une conidie de la plante. Cette spore végète et bourgeonne en différents points. Ces bourgeons en forment de nouveaux et constituent des séries de chapelets autour de la cellule primitive. Ceci a lieu surtout lorsque la plante est à

l'abri de l'air. Ces chapelets sont formés de conidies qui se séparent et vont ensuite germer pour leur compte personnel.

Mais si la plante se trouve dans l'air, il se produit souvent des bourgeons allongés en forme de tubes (véritables rameaux). A un certain moment, le rameau se cloisonne en un point. C'est à la fois l'asque et la spore. Si l'on avait réellement une ascomycète, dans cette cellule



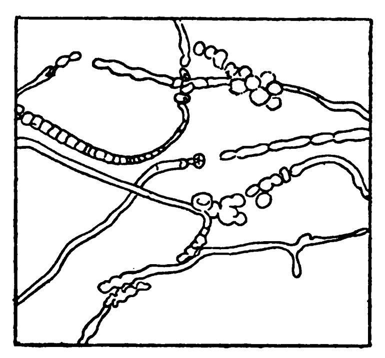


Fig. 28-29. — Amylomyces Rouxii.
D'après les annales de la brasserie et de la distillerie.

se formerait un bourgeonnement intérieur qui serait la spore. Ici c'est l'asque elle-même qui joue le rôle de spore (1). Elle se détache et se met à végéter.

L'optimum de température est compris entre 23° et 38°, l'amylomyces est tué en 30′ à 75° ou en 15′ à 80°.

Voilà donc une première plante qui n'est pas une ascomycète véritable, mais elle n'est pas non plus une oomycète puisqu'elle ne donne pas d'œuf, ni une basidomycète puisqu'elle ne donne pas de baside.

C'est donc à tort qu'on la classe quelquefois parmi les mucors qui sont des oomycètes.

---

(1) Il y a donc une sorte de scissiparité, mais avec cette différence que les fractions formées ne sont pas équivalentes entre elles.

2° ***Dematium.*** — Il existe sur le raisin (fig. 30) ; il est formé d'un certain nombre de grands filaments qui au moment de la période de repos se scindent en un certain nombre d'articles brun verdâtre. De ces articles naîtront des rameaux nouveaux. Ces articles jouent donc le rôle de spores (1). En même temps il se forme sur le mycélium des bourgeons rappelant la forme de la levure. Ce sont les conidies.

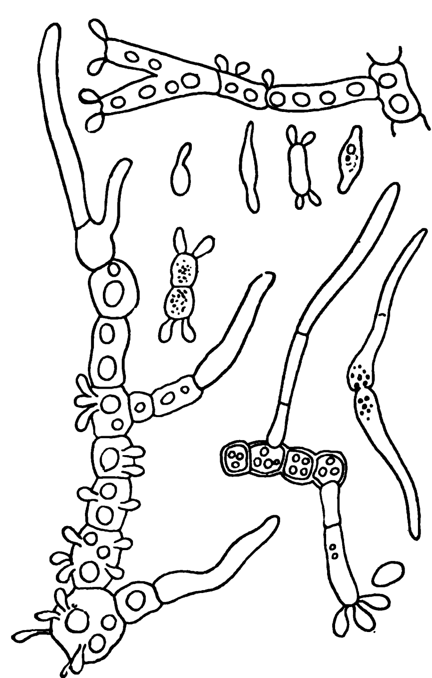


Fig. 30. — Dematium Pullulans. D'après Jorgensen.

3° ***Ascomycètes proprement dits.*** — Les asques sont ordinairement portées par des filaments feutrés formant une sorte de tissu particulier appelé *périthèce*. Elles se trouvent réparties en différents points de ce tissu, sont serrées les unes contre les autres et forment un deuxième tissu appelé *hymène*.

Deux cas sont à distinguer. Il peut se faire que l'hymène soit interne ou externe par rapport au périthèce.

1° **Ascomycètes à hymène interne.** — Dans les espèces

---

(1) Le dématium se reproduit donc en partie par scissiparité, il tient donc des Algues.

intéressantes pour nous, le périthèce prend ordinairement la forme d'un tubercule allongé ou d'une tige. Si on regarde la plante au microscope on a des aspects rappelant plus ou moins les inflorescences d'une plante ordinaire.

Il y a cependant un cas important où le périthèce est en forme de boule.

Parlons d'abord des espèces où le périthèce est allongé.

Dans les espèces qui nous intéressent, c'est la forme de ce tubercule qui est caractéristique. Si ce tubercule est ramifié, c'est le genre *aspergilus*. S'il n'est pas ramifié mais recourbé sur lui-même, c'est le genre *penicillium*. Enfin, s'il est non ramifié et droit, c'est le genre *oïdium*.

Mais ce qui distingue ces différents genres ce n'est pas surtout la forme du tubercule, ce sont leurs conidies qui sont portées sur une partie enflée appelée sclérose.

Voyons comment se reproduisent les conidies dans ces trois genres :

1° Genre aspergilus. — Le rameau où doit se produire les conidies se renfle à l'extrémité, mais ne se cloisonne pas. Autour du renflement se produisent de petites protubérances en forme de bouteilles, se ramifiant souvent autour du goulot en donnant des protubérances secondaires. Les protubérances externes (stérigmates) s'arrondissent par l'extrémité, s'étranglent, s'isolent par une cloison ; ce sont les premières conidies. Celles-ci bourgeonnent au point extrême, de sorte qu'il se forme par bourgonnements successifs des chapelets de petites cellules. Ces chapelets sont disposés en rayons autour du renflement et produisent un aspect qui rappelle la fleur de l'oignon. Ces cellules sont les conidies.

2° Genre penicillium. — Dans ce genre, le rameau qui va produire les conidies est souvent dichotome, il se renfle, se cloisonne ; la cellule ainsi formée bourgeonne comme plus haut et forme des chapelets de conidies disposés en pinceaux.

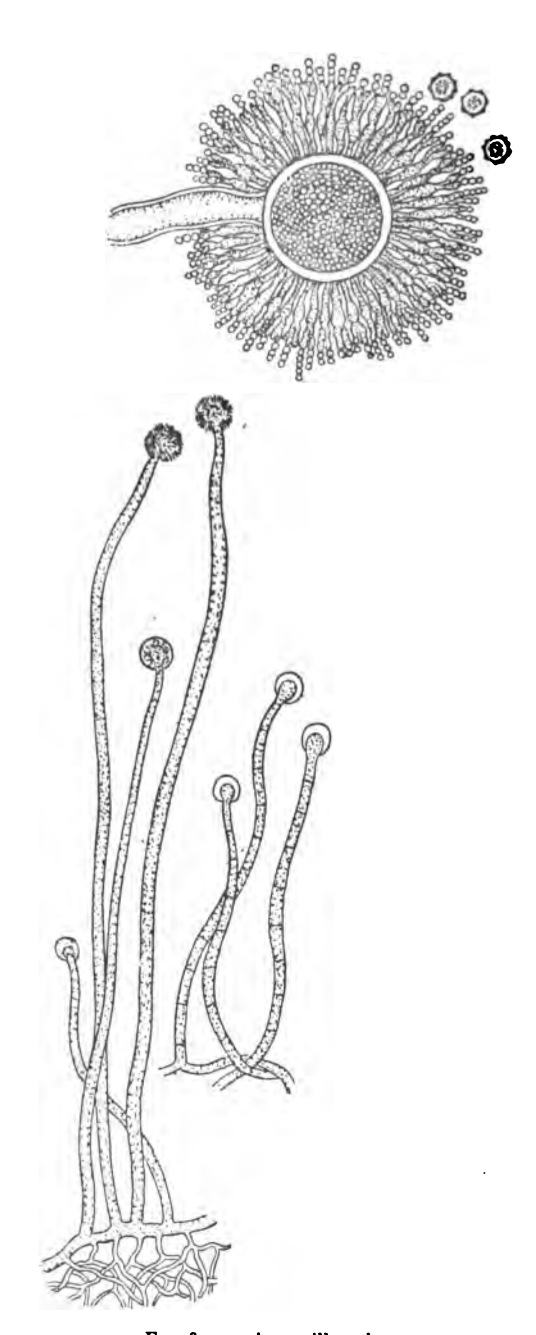


**Fig. 31. — Aspergillus niger.
D'après M. Duclaux.**

3° GENRE OÏDIUM. — Le rameau qui donne les conidies se cloisonne et bourgeonne par l'extrémité en donnant un seul chapelet de conidies.

PRINCIPALES ESPÈCES. — **Aspergillus niger** (fig. 31), vit sur le pain humide ou mouillé de vinaigre, dans l'eau de levure acide, sur les tranches de citron, dans les liquides artificiels tels que liquide de Raulin. La sclérose est jaune brun ; les conidies sont véruqueuses, violet brun, paraissant noires, rondes de 3-6 μ de diamètre.

Aspergillus orizæ, vit sur le riz cuit, est employé au Japon pour faire le saké, ses spores sont diastasiques et il agit par lui-même comme levure. Les conidies sont brun olivâtre.

Aspergillus glaucus, conidies rondes, véruqueuses, verdâtres.

Penicillium glaucum (fig. 32 et 33), sur les fruits, le malt moisi, le fromage de Roquefort, les conidies sont vertes.

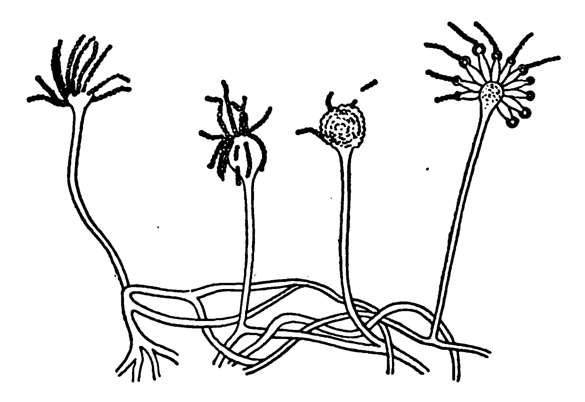


FIG. 32. — Penicillium glaucum.
D'après Guichard.

REMARQUE. — Il existe des moisissures voisines : les citromyces qui sont employés à la fabrication de l'acide citrique et les lactomyces employés à la fabrication de l'acide lactique.

Oïdium lactis, vit sur le lait. Rien de particulier (fig. 34).

Oïdium Tuckerii, oïdium de la vigne, on le détruit en soufrant les grappes.

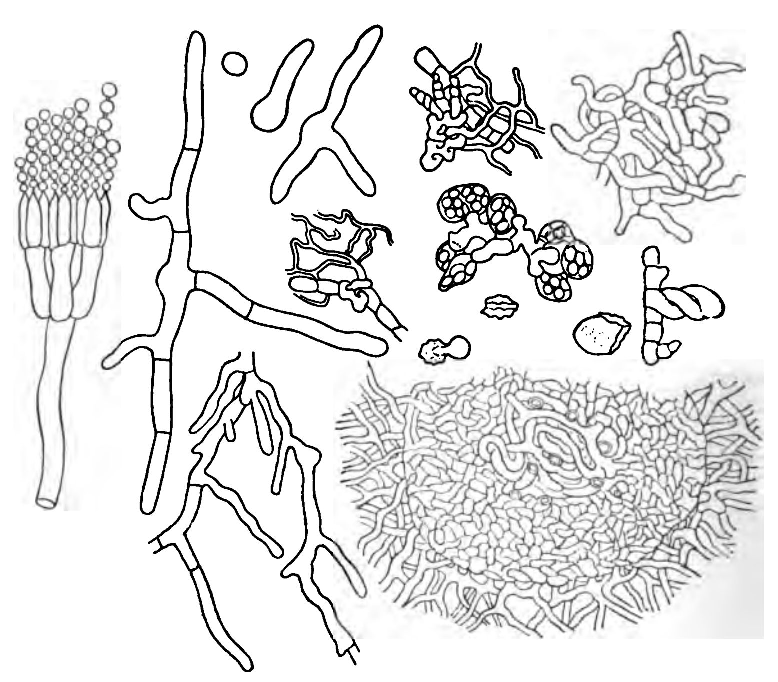


Fig. 33. — **Penicillium glaucum.**
D'après Jorgensen.

Oïdium Aurantium, vit sur le pain, les conidies sont oranges.

Parlons maintenant des ascomycètes à hymène interne placé sur un périthèce en boule ; une seule espèce nous intéresse, c'est l'Eurotiopsis Gayoni.

Eurotiopsis Gayoni se produit sur l'empois d'amidon laissé à l'air et forme des taches rouge-sang suintant d'un mycélium feutré.

Le rameau qui doit former le périthèce se renfle et

forme une boule de 50-60 μ. A l'intérieur prennent naissance les asques à 8 spores pointues aux 2 bouts (4-6 μ); a un certain moment les asques disparaissent, les spores

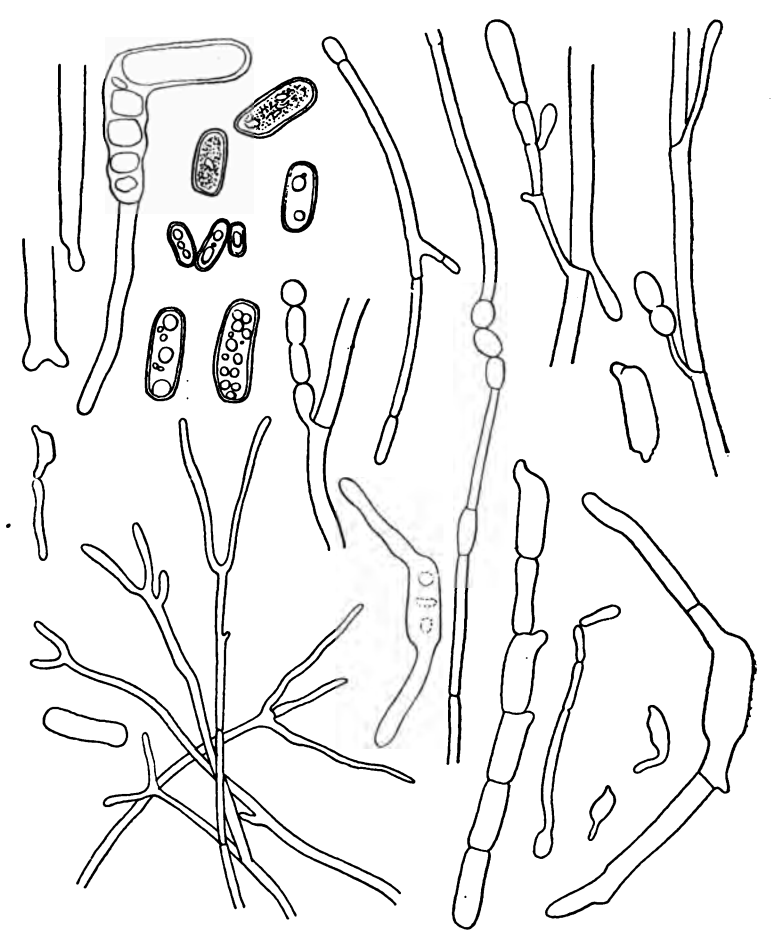


Fig. 34. — Oïdium lactis.
D'après Jorgensen.

restant dans le périthèce ; elles germent et percent celui-ci, s'élargissent au dehors et se résolvent en dedans.

Les tubes se ramifient à l'extérieur et à leur extrémité se forme des chapelets de 2-4-6 conidies.

Les spores sont tuées à 60°, les conidies à 80°; ce qui fait qu'on a pu étudier facilement les générations issues de spores.

Remarque. — Le Claviceps pourpre (ergot de seigle) est un ascomycète à hymène interne qui s'ouvre au sommet. C'est donc un cas intermédiaire entre celui des hymènes internes véritables et celui des hymènes externes.

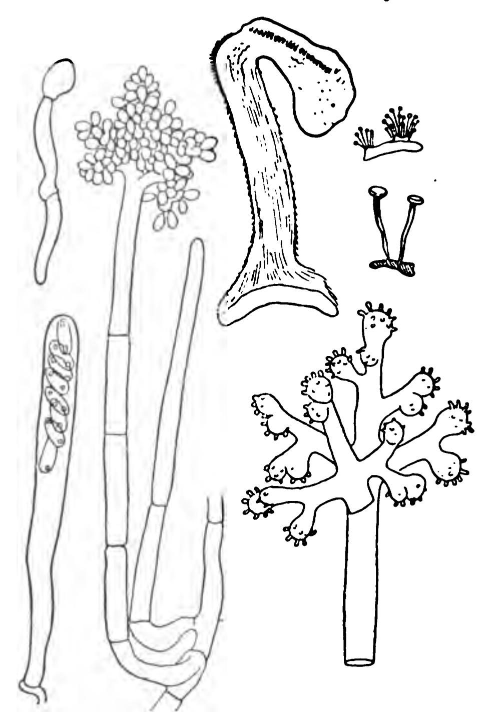


Fig. 35. — Botrylis cinérea.
D'après Jorgensen.

II. — **Ascomycètes à hymène externe.** — Les asques sont extérieures au périthèce.

Botrytis cinerea (fig. 35), se trouve dans le vin enfumé.

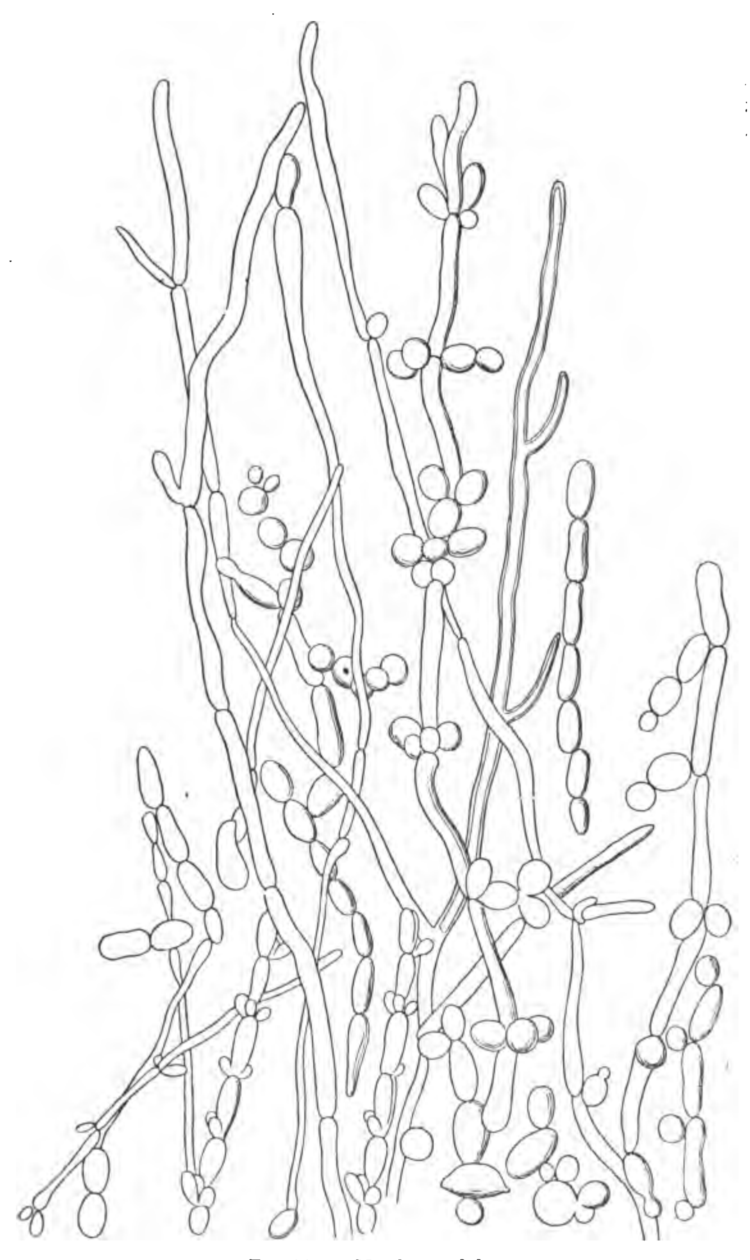


Fig. 36. — Monilia candida.
D'après Jorgensen.

C'est la plante qui cause la maladie du vin appelée la casse. Cette maladie est bien connue. C'est le résultat d'une oxydation de la matière colorante par une oxydase sécrétée par le botrytis cinerea. La matière oxydée se précipite et laisse un liquide jaunâtre. On trouve aussi cette plante sur le sol des serres (maladie de la toile).

Elle a un mycélium brun gris possédant un périthèce s'étalant en plateau qui supporte extérieurement les asques. Ces asques donnent toujours 8 spores.

La plante fournit aussi des conidies. Voyons comment elles se reproduisent.

Un tube sort du liquide et se divise en articles. A chaque tube naissent 4 ou 5 rameaux primaires et à chacun de ces rameaux primaires s'attachent 1, 2, 3 rameaux secondaires, les plus bas étant les plus longs.

Ces rameaux secondaires se cloisonnent. Ce sont les cellules résultant du cloisonnement qui sont les conidies.

Elles viennent former au-dessus du liquide un tissu velouté d'un vert bleuâtre d'où le nom de cinerea.

Monilia candida (fig. 36), espèce voisine de la première et qui vit sur le fumier. Les conidies se forment à même le thalle sans rameau. Elle n'a pas grande importance en distillerie ; on a signalé une espèce voisine, la Monilia Javanica, qui vit dans le mout d'Arrak.

Levures. — Les *levures* sont des ascomycètes à hymène externe. Nous les étudierons à part.

Physiologie des moisissures.

Alimentation.

Les moisissures préfèrent les milieux acides [1 gramme d'acide sulfurique par litre ou 3 grammes d'acide tartrique].

Elles exigent de l'oxygène et une alimentation comprenant des matières salines, azotées et hydrocarbonées.

Pour se faire une idée de l'alimentation des moisissures, il faut évidemment étudier un grand nombre d'espèces.

Pour chaque espèce, l'on procède par tâtonnement, on essaie successivement différents mélanges, et on pèse le poids de plante séchée à 100° produit dans chaque cas. Le mélange qui fournit le poids le plus élevé est le meilleur. Seulement il faut tenir compte que le poids réalisé dans une culture n'est pas absolument constant, il peut par exemple varier de 5 pour 100. Donc on ne devra tirer de conclusions que pour les variations supérieures à 5 pour 100.

Au point de vue de l'alimentation minérale on peut se faire une idée de ses nécessités en étudiant les cendres de la plante; mais il faut remarquer que la plante peut être imbibée par osmose de sels non nutritifs qui se retrouvent cependant dans les cendres.

Alimentation saline. — Un grand nombre de sels sont indispensables. Ainsi la cellule de l'aspergillus niger réussit particulièrement bien dans le liquide de Raulin (1870) dont la composition est au point de vue de la fabrication :

Eau.	1500
Sucre candi.	70
Acide tartrique.	4
Nitrate d'ammoniaque.	4
Phosphate d'ammoniaque. . . .	0,60
Carbonate de potasse.	0,60
Carbonate de magnésie. . . .	0,40
Sulfate d'ammoniaque.	0,25
Sulfate de zinc.	0,07
Sulfate de fer.	0,07
Silicate de potasse.	0,07

En tenant compte de la composition de ces corps on voit que l'ensemble des éléments de la liqueur de Raulin est représenté par les chiffres suivants :

Eau.	1500
Sucre candi.	70
Acide tartrique.	4
Ammoniaque.	2
Acide phosphorique.	0,4
Acide sulfurique.	0,25
Acide silicique..	0,03
Potasse.	0,40
Magnésie.	0,20
Oxyde de zinc	0,04
Oxyde de fer.	0,03
Oxyde de manganèse.. . . .	0,03

Il faut remarquer l'absence de chaux et de soude et la présence du manganèse alors qu'on ne met pas de composés de ce corps (c'est une impureté des autres éléments).

Comme la culture a besoin d'être aérée, on la fait dans des vases plats et rectangulaires (cuvettes photographiphes) en couches de 30 à 35 millimètres; des couches plus profondes ne sont pas suffisamment aérées, des couches plus petites manquent d'aliments. On opère à 37° de température dans un milieu humide (60° de l'hygromètre à cheveux).

Si on fait le troisième jour et le sixième jour une récolte, l'ensemble du poids sec des récoltes peut être, en trois jours, de 30 à 35 grammes (1) de plante séchée à 100° par 10 grammes de sels incorporés à la liqueur Raulin (soit environ 25 grammes de plante sèche pour la formule précédente).

---

(1) C'est environ le 1/3 du poids du sucre ; avec l'eurotiopsis qui végète plus lentement on fait environ 35 pour 100 du poids du sucre. La proportion semble assez générale.

La suppression d'un aliment quelconque de la liqueur amène une réelle diminution de la récolte. — Par la suppression de (1) :

l'ammoniaque, la récolte tombe au		$\frac{1}{153}$	de ce qu'elle était,
l'acide phosphorique	—	$\frac{1}{180}$	—
la magnésie	—	$\frac{1}{91}$	—
la potasse	—	$\frac{1}{25}$	—
l'acide sulfurique	—	$\frac{1}{25}$	—
l'oxyde de zinc	—	$\frac{1}{10}$	—
l'oxyde de fer	—	$\frac{1}{2,7}$	—
la silice	—	$\frac{1}{1,4}$	—

L'addition de certains sels est nuisible :

le nitrate d'argent	à la dose de	$\frac{1}{1\,600\,000}$	arrête la végétation,
le sublimé	—	$\frac{1}{900\,000}$	—
le chlorure de platine	—	$\frac{1}{8000}$	—
le sulfate de cuivre	—	$\frac{1}{240}$	—

Il est bien entendu que ces doses nocives se rapportent à l'aspergillus niger et à la liqueur de Raulin.

(1) M. Duclaux fait à ce sujet une réflexion intéressante ; il observe que les corps employés ne sont pas absolument purs, que par conséquent les suppressions opérées peuvent ne pas être radicales, et il se demande si les diminutions de rendement ne seraient pas autrement grandes en opérant sur des produits rigoureusement purs.

Avec une autre plante ou un autre milieu nourricier on aurait d'autres résultats.

Ainsi Maill a montré que le penicillium glaucum pousse dans une liqueur contenant entre autres de la saccharose, de l'acide tartrique, du sulfate d'ammoniaque et du sulfate de cuivre. Vient-on à remplacer la saccharose par de la glucose et l'acide tartrique par de la peptone que la végétation s'arrête complètement, sauf le cas d'un très grand excès de sulfate d'ammoniaque qui donne une levure végétative.

M. Duclaux insiste avec raison sur le rôle différent que les différents aliments paraissent jouer.

Faisons 2 cultures d'aspergillus dans du liquide de Raulin privé de zinc ; les 2 cultures sont naturellement très étiolées.

Si on récolte et si on réensemence, les nouvelles récoltes seront encore plus faibles ; ajoutons alors le zinc qui manque à l'une des cultures et réensemençons les 2 vases, l'un va donner une belle récolte, et l'autre presque rien.

On peut conclure de ces expériences que le zinc est à proprement parler un aliment.

Faisons des expériences analogues en supprimant le fer.

On remettra en vain du fer, les cultures ne reprendront pas.

Ici le manque de fer a non seulement arrêté le développement de la plante comme le manque d'oxyde de zinc, mais il a été cause d'un empoisonnement du milieu de culture, soit par suite de la formation de toxines accidentelles, soit par suite de la non-coagulation des toxines habituelles.

Alimentation azotée des moisissures. — Elle peut se faire soit par des nitrates, des sels ammoniacaux, des albuminoïdes (surtout peptonisés).

On a étudié avec soin le cas de l'Eurotiopsis.

De tous les sels ammoniacaux, le nitrate est le meilleur

au point de vue du rendement et de la rapidité ; ensuite viennent les sels ammoniacaux à acides organiques, puis enfin les sels à acides minéraux ; ceux-ci devenant libres ont une action gênante.

L'azote organique peut provenir des différents albuminoïdes des peptones, de l'urée, des amides. On a un rendement un peu plus grand qu'avec le nitrate d'ammoniaque, mais plus lent.

Alimentation hydrocarbonée. — **Exemple de l'aspergillus niger.** — Lorsque l'on supprime pour l'aspergillus le sucre de la liqueur de Raulin, la végétation devient très faible et l'acide tartrique brûle complètement, tandis que dans la liqueur normale l'acide tartrique ne brûle que quand il n'y a plus de sucre.

L'acide tartrique peut donc être un aliment, mais il joue surtout le rôle d'acide et d'antiseptique : A la dose de 1/1000 les cultures peuvent s'infecter. Au delà, jusqu'à 6/1000 les cultures vont bien et la récolte est indépendante de la dose d'acide. Enfin, à partir de 6/1000, la récolte diminue pour disparaître à 25/1000.

Si l'on veut étudier l'alimentation hydrocarbonée le mieux est de remplacer l'acidité due à l'acide tartrique par une acidité sulfurique (1 gramme par litre). Dans cette nouvelle liqueur, on remplace successivement le sucre par les différentes matières à étudier.

Le sucre est un aliment, puisqu'il est la base de la liqueur de Raulin ; mais il est en réalité inverti par la plante et assez lentement, car après 48 heures on retrouve de la saccharose.

En dessous de 12 pour 100 de sucre, le poids produit représente un peu moins du 1/3 du sucre disparu ; de 12 à 15 pour 100 de sucre, c'est sensiblement le 1/3. Au delà de 15 pour 100, le poids est de nouveau inférieur au 1/3 du sucre disparu et tend à diminuer à mesure que le sucre augmente.

Il est évident que le sucre manquant qui n'a pas été employé à la constitution ou si l'on veut à la construction des cellules, n'a pas brûlé en pure perte. Une partie a fait de la chaleur qui a servi à constituer aux dépens du sucre qui se retrouve, au moins partiellement, en poids dans les cellules, les corps plus riches en charbon et plus pauvres en oxygène qui existent dans les cellules (amidon, cellulose, etc.). Une autre partie a servi aux dépenses d'entretien des cellules vivantes.

Le sucre inverti à l'avance est un meilleur aliment que la saccharose, ce n'est pas étonnant puisque nous savons que celle-ci s'invertit.

La lactose et la mannite sont de mauvais aliments. D'ailleurs une culture sur saccharose portée sur lactose continue à végéter, donc la lactose est un bon aliment d'entretien.

L'amidon cru est très mauvais; au contraire, à l'état d'empois ou légèrement saccharifié, il est un bon aliment. L'amidon cru sans acide tartrique ne produit pas la germination des spores d'aspergillus. S'il y a de l'acide tartrique, celui-ci est brûlé en premier et la germination a lieu; la plante alors peut utiliser l'amidon.

L'alcool produit une plus mauvaise germination que l'acide tartrique seul, mais la plante formée résiste très bien à 6 pour 100 d'alcool.

Les alcools supérieurs sont d'autant plus dangereux qu'ils sont plus complexes.

L'acide acétique est toléré à la dose de 6-8 pour 100; l'acide butyrique à celle de 0,1 pour 100; 0,5 pour 100 de cet acide sont absolument toxiques.

Les acides acétique, tartrique, butyrique, en mélange, sont consommés dans cet ordre.

De l'alimentation hydrocarbonée de l'aspergillus, en présence des sels de Raulin, on obtient toujours comme résidus de l'acide carbonique et de l'acide oxalique.

Cet acide pourrait être utilisé pour la fabrication du sel d'oseille.

Si l'on cultive l'aspergillus niger en présence soit des nitrates de potasse, de chaux, de soude ou d'ammoniaque, soit du phosphate ou de l'oxalate d'ammoniaque, on a encore le même résultat. Mais en présence de carbonate ou de sulfate d'ammoniaque, il n'y a plus d'acide oxalique, surtout si la température est supérieure à 15°.

Ceci nous amène à remarquer que la liqueur de Raulin est pour l'aspergillus niger un aliment en quelque sorte idéal, qui est rarement réalisé et que l'alimentation véritable de cette moisissure dépend des circonstances extérieures.

Autres moisissures. — Il est évident que pour toutes les espèces il en est de même. On pourrait pour chaque moisissure déterminer une alimentation idéale qui sans doute ne serait pas la liqueur Raulin, mais les différentes plantes pourraient vivre faute de mieux dans une infinité d'autres milieux.

A ce point de vue des différentes espèces, nous pouvons citer quelques cas intéressants :

Avec le penicillium glaucum on a des résultats à peu près analogues à ceux de l'aspergillus. Il y a cependant un certain nombre d'observations à faire. Si on constitue une liqueur de Raulin en remplaçant l'acide tartrique droit ordinaire par l'acide tartrique inactif par compensation (ac. racémique), on trouve comme résidu de l'acide tartrique gauche, le penicillium préférant pour sa nourriture la partie droite de l'acide racémique que l'on peut considérer comme une combinaison d'acide droit et d'acide gauche.

L'alcool amylique secondaire (méthylpropyl-carbinol) ou pentanol-2 $CH^3 — CH.OH — CH^2 — CH^2 — CH^3$ se comporte de même. Avec l'alcool amylique primaire de fermentation (2 méthyl-1 butanol $CH^3 — CH^2 — CH \langle {CH^2OH \atop CH^3}$ c'est la partie droite qui résiste).

Le penicillium glaucum aide d'autres microbes pour la formation d'acide gallique aux dépens du tan.

Les citromyces, le mucor piriformis donnent de l'acide citrique au lieu d'acide oxalique.

L'alimentation hydrocarbonée de l'Eurotiopsis a été étudiée en détail.

Le sucre inverti, la glucose, la lévulose, la mannite sont les aliments de prédilection ; en 6 jours on a à peu près de 25 à 30 pour 100 du poids du sucre. L'amidon, les dextrines, la maltose et la galactose donnent un rendement pareil en 8 jours ; la lactose, la glycérine, l'alcool donnent un rendement plus fort mais en 10 ou 20 jours. M. Duclaux fait remarquer à ce sujet que si l'on appelle bon aliment celui qui fournit le plus de plante dans le temps le plus court, c'est le sucre inverti qui est l'idéal : si au contraire l'aliment est la matière la plus économique, c'est l'alcool qui vient en tête.

Enfin, les spores des moisissures vivent en milieux acides, mais elles s'acclimatent aux milieux alcalins.

Conditions de température.

Moisissures proprement dites. — Les moisissures peuvent vivre entre deux limites de température. Suivant les espèces, ces limites sont différentes. Ordinairement elles sont comprises entre 10° et 30° ou 35°. Il y a cependant des cas exceptionnels comme par exemple celui du penicillium glaucum qui germe dans les caves de Roquefort à 2°,5 ; le botritys qui germe à 1°,6 ; l'ustilago carbo qui germe à 0°,5.

La limite supérieure de résistance est d'ailleurs d'autant plus élevée que la durée de l'action de la température est plus courte.

Pour chaque espèce, indépendamment des 2 limites, il y a une température optimum.

Dans son étude sur l'aspergillus, Raulin a trouvé qu'en trois jours

à 19°	il se forme	0gr,3	de plante sèche
à 32°	—	3gr,5	—
à 34°	—	4gr,2	—
à 36°	—	4gr	—
à 42°	—	3gr	—

Ce qui prouve que 34° est un optimum au point de vue de la nutrition; c'est également le point où la sporulation est la plus active.

En présence de l'eau, toutes les moisissures sont tuées à 55°.

Spores. — Les spores, moins hydratées que les moisissures, résistent mieux à la chaleur que les plantes elles-mêmes. Ainsi les spores du penicillium glaucum germent encore après avoir passé 48 heures à 108° ou après 30 minutes à 120°. Il faut les laisser 30 minutes à 130° pour qu'elles meurent.

Les spores de l'ustilago carbo résistent à 120°; celles de l'oïdium aurantium ne meurent qu'à 140°.

En présence de l'eau les spores meurent en général vers 55°. Cependant celles du penicillium glaucum meurent à 61°; celles de l'ustilago à 58-62°.

A mesure que les spores s'hydratent, elles deviennent plus sensibles à la chaleur; c'est ce qui explique la méthode de stérilisation de Tyndall. Des spores ont résisté à la première ébullition qui ne résistent pas aux suivantes, parce qu'elles sont plus hydratées.

Action de la lumière sur les moisissures.

On peut dire d'une manière générale qu'une lumière vive ou même diffuse et prolongée est nuisible. M. Duclaux pense que la lumière gêne surtout la dépense de construction. De sorte qu'une plante en croissance voit

sa respiration diminuer à la lumière; tandis qu'une plante adulte n'offre pas de différence à la lumière et à l'obscurité.

Pour étudier les effets véritables de la lumière il faut se mettre à l'abri des effets calorifiques, bien plus considérables que les autres. Il faut aussi ne pas oublier que la lumière seule peut produire dans les bouillons de culture de l'acide formique, du peroxyde d'hydrogène, de l'ozone, tous corps capables d'agir par eux-mêmes sur les moisissures. On a l'habitude de se servir, pour étudier les rayons les moins réfringents, d'un écran formé d'une solution de bichromate de potasse, et pour les rayons plus réfringents d'un écran formé d'une solution de sulfate de cuivre ammoniacal. On peut aussi éliminer les rayons ultra-violets par un écran formé d'une solution de sulfate de quinine.

Comme expériences relatives à l'action de la lumière sur les moisissures, nous citerons celles d'Elfving.

Du penicillium cultivé en présence de glucose ou de mannite donne à la lumière diffuse moitié du poids obtenu à l'obscurité. La lumière solaire est encore plus défavorable.

Opère-t-on en présence de peptone, les résultats sont les mêmes quel que soit l'éclairement.

Il semble que ce sont les rayons chimiques qui soient les plus nuisibles et qu'il y aurait exagération de la proportion d'azote assimilée et diminution des éléments hydrocarbonés.

Au point de vue de la sporulation, la partie la moins réfrangible du spectre paraît favoriser la maturation des sporanges et la partie la plus réfrangible paraît agir comme la lumière blanche.

Tous les résultats précédents sont d'une généralité incertaine pour deux raisons, parce qu'ils dépendent des espèces examinées, et qu'ensuite ils n'ont pas toujours été obtenus en se mettant à l'abri des effets calorifiques.

Un grand nombre de moisissures présentent des phé-

nomènes d'héliotropisme. Ainsi le claviceps purpurea et le mucor mucedo présentent de l'héliotropisme positif.

Diastases provenant des moisissures.

A) ***Aspergillus niger.*** — L'*aspergillus niger* est capable de transformer l'amidon en glucose (non en maltose) ; la saccharose, la tréhalose, l'amygdaline sont également inverties.

D'après les idées actuelles on est amené à admettre la présence de diastases spéciales à chaque cas particulier, c'est-à-dire de glucase (1), de sucrase, de tréhalase, d'émulsine. Ces enzymes n'apparaissent pas simultanément; cependant l'émulsine paraît exister en tout temps.

Malfitano vient de mettre en évidence une diastase protéolytique. Une culture sur liquide Raulin portée sur gélatine au thymol à 35° la liquéfie, à moins d'avoir été elle-même portée à l'ébullition. Cette diastase se produit proportionnellement au développement de la plante, mais on ne la trouve dans le liquide qu'à la décomposition de celle-ci.

Glucase. — En ce qui concerne la glucase, il convient de faire les observations suivantes :

1° Ce sont les cellules bien nourries qui en fournissent le plus (2). Les nitrates, les peptones, la caséine, l'urée conviennent mieux que les sels ammoniacaux ;

---

(1) Avec les idées actuelles on doit considérer la glucase comme un mélange d'amylase et de maltase.

(2) Les conditions générales de production d'une diastase dans une moisissure sont :

1° Milieu très nutritif contenant la substance à hydrolyser et très aéré ;

2° Température convenable.

Mais ces conditions de production ne sont pas toujours celles de diffusion qui permettent l'utilisation de la moisissure sans détruire celle-ci. Ces conditions se réduisent à la dénutrition par épuisement des ressources alimentaires et manque d'air.

2° La quantité de glucase qui diffuse augmente au moment où, le milieu nutritif s'épuisant, la plante attaque les aliments de réserve;

3° La présence d'amidon n'est pas indispensable dans le milieu nutritif;

4° 30 pour 100 de saccharose ajoutés à un milieu amylacé gêne considérablement la sécrétion;

5° La maltose gêne à un degré moindre; de même la glycérine, l'érythrodextrine, l'acide tartrique;

6° Lorsque le milieu contient une forte quantité de glucase, la sécrétion se ralentit, elle reprend si on précipite la glucase existante par le tanin.

Sucrase. — 1° La sucrase d'aspergillus n'est pas filtrable à la bougie, comme la sucrase de levure; elle paraît plus résistante aux influences de milieu;

2° Comme une faible acidité est utile à la sucrase et que la sucrase d'aspergillus contient par elle-même de l'acide oxalique, cette sucrase est plus sensible aux acides que la sucrase de levure;

3° La sucrase diffuse surtout au moment de la dénutrition ou lorsque l'on gêne la fructification en empêchant l'action de l'air;

4° La présence de la saccharose n'est pas indispensable pour la formation de la sucrase, c'est surtout une question de nutrition;

5° C'est avec l'aspergillus niger que l'on prépare le plus facilement la sucrase. D'après Duclaux, on cultive sur liqueur de Raulin de l'aspergillus pendant 4 jours jusqu'à coloration brun olivâtre. On décante, on met de l'eau stérilisée et après 2 ou 3 jours on filtre le liquide.

B) ***Aspergillus oryzœ.*** — C'est la moisissure qui contient le plus de glucase. Elle contient de la sucrase et une peptase.

L'aspergillus oryzœ cultivé sur du riz cuit rend celui-ci soluble. Un contact immédiat du riz avec l'eau froide en

dissout 12 pour 100 environ; en prolongeant l'action on peut atteindre 60 pour 100.

L'acide lactique à la dose de 0,05 pour 100 est favorable, la dose de 0,1 a un effet de ralentissement, la dose de 0,6 arrête complètement l'action.

Le sel marin a un effet retardateur très marqué et d'autant plus prononcé qu'il est plus abondant.

L'aspergillus oryzœ contient de la sucrase qui ne peut convertir la saccharose que jusqu'à 70 pour 100 seulement.

Enfin, dans l'aspergillus oryzœ doit se trouver une peptase. En effet, tandis que le riz contient environ 11 pour 100 de ses albuminoïdes à l'état soluble, le riz attaqué par l'aspergillus en contient 90 pour 100 environ.

C) ***Mucor circinelloïdes.*** — Il contient également beaucoup de glucase; le mucor racemosus contient de la sucrase.

D) ***Penicillium glaucum.*** — Il contient des diastases analogues à celles de l'aspergillus niger, mais sa glucase est plus sensible à la saccharose dont 10 pour 100 arrête toute sécrétion. De même pour la glucose.

E) ***Amylomyces Rouxii.*** — Cultivé dans un milieu aéré, il émet peu de glucase, car $2^{gr},81$ de plante produite ne suffisent pas à saccharifier 15 grammes d'amidon qui le seraient par $0^{gr},5$ de malt.

En milieu moyennement aéré, la production en elle-même est moins forte, mais la diffusion est plus grande, de sorte que l'action est plus vive.

F) ***Botrytis cinerea.*** — Il contient une diastase pouvant invertir la saccharose. On a hésité longtemps à admettre l'existence de cette diastase. On se trouve dans un cas analogue à celui que nous examinerons à propos de la maltase de la levure. Si l'on fait agir le botrytis cinerea sur la saccharose, celle-ci disparaît en se transformant en alcool, et on ne retrouve à la fin de l'opération ni glucose, ni lévulose. Il y a cependant inversion,

mais la glucose et la lévulose fermentent au fur et à mesure de leur production. En prenant les mêmes précautions que pour la maltase de la levure, c'est-à-dire en faisant un extrait de la plante sèche, on isole la diastase.

Enfin, le botrytis cinerea renferme une oxydase, l'œnoxydase voisine de la *laccase* et qui produit la casse du vin.

G) ***Monilia candida.*** — Il présente une particularité. Employée à l'état frais, cette plante n'invertit pas la saccharose. On ne retrouve ni glucose, ni lévulose, ni alcool. Si l'on prend la plante à l'état sec, l'inversion se produit. Cela tient à ce que la sucrase n'est pas diffusible à travers les parois de la plante fraîche, probablement parce qu'elle est combinée.

H) ***Eurotiopsis Gayoni.*** — Il sécrète tous les enzymes sauf la sucrase ; si quelquefois, en présence de sels ammoniacaux, il y a inversion de la saccharose c'est que l'acide du sel devient libre. Il y a une sorte de glucase qui craint les acides et qui est d'une action très lente. Il existe une lactase, une tréhalase, de l'émulsine, une caséase dont l'action ne se prolonge sur le lait que si on neutralise.

Il est probable que dans les moisissures peut se former de la zymase, car nous allons voir que les moisissures peuvent produire la fermentation.

Modifications des moisissures dues aux changements de milieu.

Lumière. — Sous l'influence de la lumière, Laurent a montré que les spores d'un penicillium, très aérobie, le P. Cladosporioïdes, ensemencées dans un moût de bière exposé au soleil, donnent non pas le penicillium mais le dematium pullulans déjà décrit, qui est capable de végéter en profondeur.

Manque d'air. — Les conditions d'aération amènent de nombreux changements de forme. — Le premier

exemple cité est celui du mycoderma vini qui, cultivé à l'air sur l'eau sucrée donne du gaz carbonique et qui, immergé, donne en outre de l'alcool.

Cas du Mucor mucedo (Pasteur). Une culture de ce mucor faite dans le ballon à col de cygne est, par la tubulure droite, envoyée dans un matras à long col que l'on remplit complètement et que l'on laisse réuni au ballon par un caoutchouc.

L'air va manquer, car celui qui était en dissolution dans le moût a été usé dans le ballon et il n'y en a pas dans le matras qui est plein de liquide. Il se dégage de l'acide carbonique, on trouve de l'alcool, le mycélium se modifie. Les tubes mycéliens se segmentent, se séparent, grossissent et donnent des chaînes de grosses cellules rondes ressemblant à de la levure. Remises dans un milieu aéré elles reprennent leur forme primitive.

Cette faculté de devenir un ferment alcoolique à l'abri de l'air paraît être *générale à toutes les cellules.*

Voici une expérience due à Lechartier et Bellamy. On prend une pomme et on la laisse en repos dans un vase contenant de l'azote ou de l'acide carbonique, ou simplement dans un vase fermé. (Le fait de la non-aération revient en effet à placer la plante dans un milieu d'acide carbonique.) Dans ce cas le fruit prend une odeur particulière d'éther et on retrouve de l'alcool libre. L'expérience faite avec un grand nombre de matières réussit toujours.

Faisons la même expérience avec une cellule de moisissure. Si l'on prive absolument d'air la moisissure, le phénomène n'a pas lieu. La cellule a en effet besoin d'oxygène pour vivre. Il est nécessaire que le milieu en contienne au moins des traces. On doit alors se demander pourquoi dans un milieu comme l'air, les cellules ne produisent pas d'alcool. Cela tient sans doute à ce que la cellule a plus d'oxygène qu'il lui en faut pour vivre, et que l'excès d'oxygène brûle l'alcool produit et altère

la zymase, laquelle étant le résultat de la vie normale de la moisissure ne peut se former que s'il y a eu de l'oxygène au début.

Il semble résulter des études comparatives faites sur cette question que toutes les cellules ont besoin pour vivre d'un minimum d'oxygène (minimum spécifique) et que dès qu'elles vivent elles donnent de l'alcool, que cet alcool tend à disparaître à partir d'une dose maxima d'oxygène, dose d'ailleurs également spécifique.

Entre deux limites d'oxygène données, il est des plantes qui ne végètent pas parce qu'elles n'ont pas le minimum voulu, il en est qui donnent de l'alcool ; il en est qui n'en donnent plus parce qu'elles ont trop d'oxygène.

Mettons donc une moisissure habituée à vivre dans l'air dans un milieu confiné où il n'y a que quelques traces d'oxygène. La vie de la cellule devient languissante. Le protoplasma au lieu d'être limpide, hyalin, homogène, devient granuleux et se rassemble au centre des cellules. La cellule perd son aspect primitif. Au lieu d'avoir une végétation plus ou moins ramifiée, tous les longs tubes tendent à se scinder en petites cellules et à former des chapelets de cellules rondes ou elliptiques rappelant la forme de la levure, et ayant la propriété de faire fermenter ; on a été même amené à se demander si ce n'était pas là l'origine de la levure. Nous reviendrons sur cette question.

C'est ce qui se passe dans le cas du mucor mucedo, déjà décrit.

Le mucor racemosus peut dans des conditions identiques faire fermenter la glucose mais non la saccharose, la lactose ou l'amidon ; ce qui veut dire que le mucor racemosus peut faire fermenter la glucose parce qu'il contient la zymase et ne contient ni sucrase, ni lactase, ni maltase.

Ici se place un fait important. Prenons une liqueur

sucrée à 10 pour 100 de sucre qui fermenterait complètement par la levure et mettons-y le mucor racemosus. La fermentation se produit mais s'arrête lorsqu'il y a 3 pour 100 d'alcool formé (1). La plante ne résiste pas comme la levure à une dose d'alcool élevée. Voici donc une première différence avec la levure.

De plus, une levure mise dans un jus sucré ferait les 3 pour 100 d'alcool en moins d'un jour. Ici il faut des mois et avec certaines espèces voisines, il faudrait des années. C'est donc là une seconde différence.

Une troisième se trouve dans le rendement. Comparons ces 3 pour 100 d'alcool formé au sucre disparu. Le rendement est très faible. La plante a continué à respirer fortement et pendant longtemps. Plus qu'une levure, elle a donc dû dépenser du sucre en le transformant en acide carbonique sans donner d'alcool.

Tous ces résultats dépendent de la nature du sucre et de celle du milieu de culture.

Tels sont les trois caractères de ces fermentations par les moisissures.

Le *mucor circinelloïdes* est capable de faire fermenter la lévulose, l'amidon, la dextrine; il contient donc de la zymase et de l'amylase. Elle ne paraît pas faire fermenter la saccharose.

La limite d'alcool paraît être de 5 pour 100 ; mais cela dépend en réalité du milieu.

---

(1) Le m. racemosus admet suivant certains auteurs jusqu'à 5 pour 100 d'alcool; cela dépend du milieu. Fitz a montré pour le m. racemosus qu'il se produit, outre CO^2 et l'alcool, de l'acidité, de l'aldéhyde succinique et peut-être de la glycérine; le poids de l'alcool produit est au poids de CO^2 dans le rapport de 1.2 à 1, tandis qu'avec la levure ce rapport est de 1,04 à 1, ce qui tendrait à prouver que les réactions ne sont pas absolument identiques.

Les mucors mucedo et spinosus supportent 2 o/o d'alcool.

A ce point de vue Gayon a cité les nombres suivants :

En moût de bière.	4,1	pour 100.
En jus de raisin.	4,7	—
En solution glucosée. . . .	3,9	—
En solution lévulosée. . . .	4,7	—

Le mucor erectus donne jusqu'à 8 pour 100 d'alcool.

L'aspergillus niger et le pénicillium glaucum font également fermenter, mais la limite d'alcool produit est excessivement faible même après une année, (0,075 pour 100 pour le premier, 0,0015 pour 100 pour le deuxième).

L'aspergillus oryzoe mis dans un milieu renfermant de l'amidon est capable de faire la fermentation alcoolique.

Ici la limite alcoolique est un peu plus élevée mais le rendement est mauvais. On n'obtient pas les 3/5 de l'alcool qu'on devrait obtenir en tenant compte de l'amidon disparu. La respiration de la plante est très active.

L'amylomyces donne un meilleur rendement. On fait industriellement de l'alcool en employant cette moisissure pure ; mais l'opération dure au moins 10 jours et la limite de l'alcool est de 7 pour 100. Aujourd'hui dans l'industrie on emploie l'amylomyces (1) simplement pour la saccharification de l'amidon. La fermentation s'achève par de la levure que l'on introduit en même temps que la moisissure.

Kayser a décrit une moisissure de l'ananas qui donne 1 pour 100 d'alcool.

L'Eurotiopsis Gayoni est sous le rapport de la culture à l'abri de l'air un cas d'un grand intérêt théorique. En effet on a vu que si l'on diminue l'aération, la plante sans

---

(1) Actuellement on emploierait de préférence d'autres moisissures, que les auteurs désignent sous les noms de mucors α, β, γ, supportant des doses d alcool plus fortes. On a aussi proposé l'emploi du mucor raccemosus.

prendre l'aspect bourgeonneant, devient plus grêle, et on retrouve de l'alcool; de plus les conditions d'aération dépendent de la nature des sucres en présence et la quantité d'alcool à obtenir varie suivant les sucres. Avec le sucre inverti on va jusqu'à 8 pour 100 d'alcool, avec la lactose invertie jusqu'à 4-5 pour 100, tandis que la galactose et la lactose ne font pas dépasser 3 pour 100.

Un mélange de maltose et de dextrine fermente mieux que les éléments séparés et, chose curieuse, on a plus d'alcool qu'avec la levure.

Les exigences variées en oxygène de cette plante en présence des différents sucres, jointes au fait que l'alcool, la glycérine, l'acide succinique sont alimentaires, font comprendre le rôle de l'oxygène dans la production de l'alcool par les plantes.

Résumé. — De tout ce qui précède nous devons donc retenir ceci :

Toute cellule qui a pu respirer et qui est ensuite privée d'air est capable de faire fermenter au moins certains sucres. Toutes ces fermentations sont lentes et n'arrivent qu'à une limite alcoolique relativement basse et donnent un mauvais rendement.

On a remarqué que dans ces moisissures la respiration est tellement active que pendant la fermentation non seulement le sucre, mais les acides organiques peuvent être brûlés. L'acidité diminue pendant une fermentation au lieu d'augmenter. Ceci est d'autant plus extraordinaire que l'on a toutes raisons de croire que les produits accessoires de la fermentation par les moisissures sont les mêmes que ceux produits par la levure elle-même. Or, ce qui, dans une fermentation normale par la levure fait augmenter l'acidité du moût, c'est la production d'acide succinique; on devrait donc avoir dans le moût fermenté par moisissures une augmentation d'acidité analogue à celle obtenue dans les moûts fermentés par le-

vures. Or, on trouve une diminution; il faut donc ou que les acides soient brûlés en partie pendant la fermentation, ou qu'ils soient neutralisés.

Cette dernière explication n'est guère probable.

Durée de la conservation des moisissures.

Pour terminer le chapitre des moisissures nous devons dire un mot de la durée de leur conservation.

Cela est essentiellement spécifique et dépend naturellement de la résistance des spores et de l'état d'humidité.

Ainsi la puccinie graminis (rouille) a sa spore qui hiverne mais qui ne résiste pas au printemps.

Les spores de certains ustilago résistent 2 ans; celles du titletia caries également.

Mais il faut tenir compte, comme l'a montré M. Duclaux, de la sensibilité particulière des vieilles spores pour les acides.

En diminuant la dose d'acide au 1/3 ou au 1/4, ce savant a pu faire germer, à l'humidité surtout, des spores de penicillium de 6 ans et d'aspergillus de 3 ans ; à l'air, la conservation des spores paraît fort longue.

Levures (saccharomyces).

La levure est une asque.

Nous avons classé les levures parmi les ascomycètes à hymène externe.

Dans les levures le thalle proprement dit n'existe que rarement ; les espèces les plus vulgaires n'en ont pas. En réalité il a existé, mais il s'est vite dissous, de sorte que le champignon, privé du mycélium, du périthèce et de l'hymène, ne garde que les asques.

Résidu du mycélium. — Il y a cependant quelques races de levures sur lesquelles on a pu observer le mycélium :

Si on cultive sur plaque de gélatine la levure, saccharomyces marxianus, autour des cellules, on voit un réseau de consistance gélatineuse ; c'est le mycélium en dissolution, non encore complètement disparu.

De même, une des levures qui fait fermenter la lactose possède un rudiment de mycélium quand on la cultive sur gélatine.

On peut également entrevoir le mycélium de la manière suivante : on abandonne dans un vase fermé de la levure, après quelque temps, celle-ci délayée dans l'eau montre le réseau.

Il y a encore d'autres cas où l'on peut retrouver le mycélium. En effet, dans une culture de levure quelconque, faite à l'abri de l'air, on aperçoit au microscope un ensemble de cellules plus ou moins arrondies (fig. 37. S. Ellypsoideus). Ramenons à la surface du bouillon une des cellules et abandonnons-la à l'air.

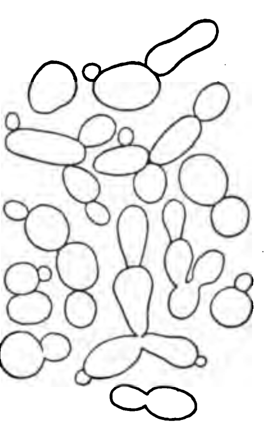


Fig. 37. — Saccharomyces ellipsoïdeus. D'après Jorgensen.

La culture change d'aspect. La cellule donne un premier bourgeon plus petit que les bourgeons normaux ; mais de ce bourgeon sortent au contraire des bourgeons allongés constituant de grandes cellules souvent ramifiées ; le mycélium est alors réapparu (fig. 38. Voile du précédent).

Ces grandes cellules (25-100 μ) se ramifient tellement qu'elles se feutrent en un voile superficiel, laissant en dessous un liquide plus clair qu'un moût où se trouveraient des cellules normales.

Ces voiles sont toujours faciles à disloquer, de sorte qu'au bout de peu de temps, le moût qui au début était clair devient au contraire trouble.

Les cellules du voile ont un aspect spécial ; souvent il y a de grandes vacuoles ; on y voit des points très refringents, verdis par l'acide sulfurique, ce qui indique leur nature huileuse.

Le voile se forme plus ou moins facilement suivant : 1° l'espèce de levure ; 2° la nature du milieu au point de

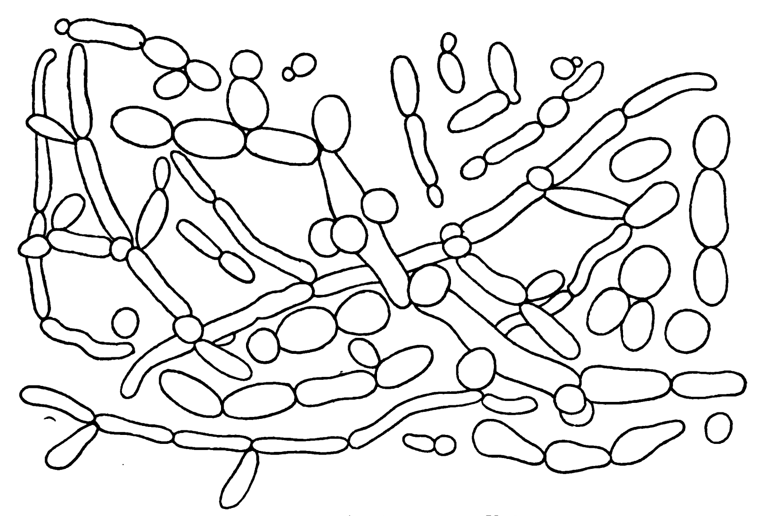


Fig. 38. — Saccharomyces. Voile. D'après Jorgensen.

vue du sucre, de l'acide, etc. ; 3° la température ; 4° les conditions d'aération. Une plus grande aération favorise la formation du voile.

Ordinairement, il n'est complet que lorsque la fermentation principale (à bouillonnement) est terminée. Mais Kayser a décrit des levures de bananes faisant leur voile pendant les 24 premières heures.

Au point de vue de la température, Hansen a montré que l'on peut caractériser les levures par les tempéra-

tures limites où les voiles se forment dans certains milieux et par les temps nécessaires à cette formation.

De plus, l'aspect du voile est caractéristique : tantôt le voile est mince et gris mat, soit que ce soit sa nature, soit que lorsqu'il devient trop épais il tombe au fond et se reforme, d'autres fois il est plissé (surtout en milieux acides, Kayser). Souvent il forme des bourrelets d'aspects divers, secs, poussiéreux, gommeux, brillants, etc. Un cas assez fréquent est celui où les cellules grimpent sur la paroi du vase et forment des anneaux, à cellules très allongées et très épaisses, quelquefois sporifères.

D'après ce que nous venons de dire, il est des cas où le mycélium reparaît chez la levure. Il n'en est pas moins vrai qu'ordinairement elle est réduite à l'asque.

Description de la levure.

Nons allons décrire avec détails cette asque qui constitue la cellule de levure (1). — Nous suivrons de très près les travaux de Janssen et Leblanc faits sur un certain nombre d'espèces.

La cellule de levure est constituée comme toute cellule par une *membrane* extérieure, contenant un *protoplasma* dans lequel se trouve un *noyau* qui enveloppe lui-même un protoplasma spécial et un deuxième noyau, le nucléole. La membrane de la cellule proprement dite est mince, incolore, élastique et de nature cellulosique. Le protoplasma de la cellule (2), quand elle est jeune, est hyalin, mais quand la cellule vieillit, il devient granu-

---

(1) Sa densité d'après Guignard est voisine de 1,18. D'après Fernbach, il y aurait 10^6 cellules au centimètre cube et leur poids serait 2 grammes.

(2) Quand on mêle de la levure à certains sels, tels que le sel marin, il y a une exsudation abondante utilisée soit comme aliment, soit comme source de diastase.

leux surtout à température élevée ; cela tient à ce que la cellule souffre ; or ces grains de protoplasma ne sont que des réserves alimentaires qui disparaissent dès que la cellule est dans un état plus satisfaisant.

Quand la matière albuminoïde du protoplasma se concentre en ces grains il ne faut pas croire que le reste de la cellule soit vide. Il s'est formé des vacuoles remplies d'un liquide plus clair qui est pour ainsi dire le sérum du protoplasma ; on trouve dans ce liquide des grains très refringents qui, traités par l'acide sulfurique, sont reconnus pour de l'huile ; on y trouve aussi du glycogène.

Arrivons au noyau. Ce noyau est ordinairement unique mais quelquefois on en trouve deux. Il est formé à son tour d'une *membrane* contenant un protoplasma appelé *caryoplasma* et enfin d'un noyau particulier le *nucléole*.

Développement.

Voyons les modifications de tous ces organes pendant la vie des cellules. La différenciation des divers organes ne peut se faire que par la méthode des colorations.

Prenons une cellule jeune et mettons-la dans un milieu nourricier.

Un peu avant la douzième heure de culture, le protoplasma commence à subir une transformation consistant pour ainsi dire en un dépôt de protoplasma se formant autour du noyau. En même temps dans le noyau on voit le caryoplasma changer absolument d'aspect. Au lieu d'être un liquide homogène comme au début, il est sillonné par des filaments formant une sorte de réseau qui embrasse et soutient le nucléole.

Vers la treizième heure se produit le phénomène inversé. Ce réseau et par conséquent les vacuoles du réseau se résorbent ; l'aspect redevient homogène. Les choses restent ainsi jusqu'à la trente-sixième heure.

A la trente-sixième heure, nouveau phénomène. Le réseau du noyau réapparaît et en même temps le protoplasma de la cellule elle-même se vacuolise et forme un réseau.

Entre la quarantième et la cinquantième heure, c'est-à-dire au moment où la fermentation est la plus active dans le milieu sucré on aperçoit sur le réseau du protoplasma de véritables granules. Ce sont les réserves alimentaires qui se forment.

A la cinquante-quatrième heure, la fermentation tombant, les granules du protoplasma se résorbent à nouveau.

Enfin vers la soixante-quatorzième heure on a de nouveau dans le protoplasma une granulation particulière formée de deux espèces de corps. Les uns sont de nature albuminoïde, les autres sont du glycogène. Voilà les différentes transformations qui se produisent à l'intérieur de la cellule pendant sa vie.

Voyons maintenant les modes de reproduction de ces cellules. Elles peuvent se reproduire par bourgeonnement extérieur (conidies) ou par spores intérieures.

Reproduction.

Reproduction par bourgeonnement. — Dans la plupart des levures, le nucléole paraît s'étirer, les deux parties restant liées par un cordon, le noyau suit le mouvement du nucléole et s'étire, puis la cellule elle-même s'étrangle, ce qui forme le bourgeon (fig. 39-40).

Cependant dans certaines levures telles que le saccharomyces Ludwigii, le sacch. Octosporus, le sacch. Pombe, il semble qu'il y ait cloisonnement. Voici ce que Janssen et Leblanc ont vu dans ce cas spécial :

Au moment où la cellule va bourgeonner, les vacuoles s'agrandissent et la membrane du noyau se dissout. Le nucléole qui est à l'intérieur du noyau s'allonge et tend à

se scinder en deux, mais les deux parties restent réunies par une sorte de cordon.

En même temps le nucléole qui est maintenant libre dans la cellule se trouve poussé vers la membrane de celle-ci. Un dépôt de matière cellulosique commence alors à se former dans le cordon. Ce dépôt s'étend d'abord par points de part et d'autre du cordon de manière à rejoindre la paroi de la cellule, puis le dépôt devient continu ; il s'est alors formé une véritable cloison mais qui ne rompt pas le cordon placé entre les deux morceaux de

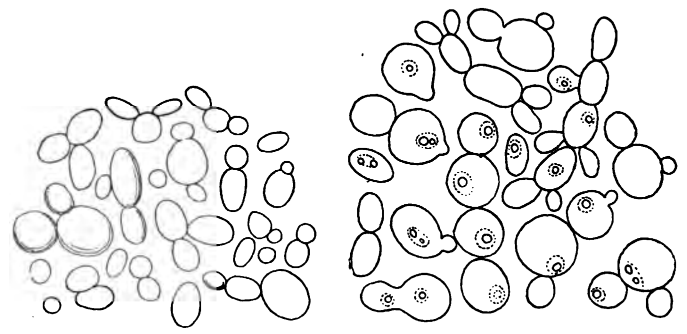


Fig. 39. — Levure basse. D'après Jorgensen.

Fig. 40. — Levure haute. D'après Jorgensen.

nucléole. Cette cloison détermine la séparation du bourgeon et de la cellule-mère.

Les nucléoles s'entourent alors de nouveau d'une membrane et constituent deux noyaux complets. La première cellule-mère se retrouve à l'état primitif ; elle est accolée à une nouvelle cellule semblable à elle-même, à un bourgeon. Dans les saccharomyces ordinaires, le bourgeonnement est-il une copie de celui que l'on vient de décrire en admettant un étirement simultané. Cela n'est pas probable, car l'enveloppe du noyau ne disparaît jamais.

Reproduction par spores. — Ce mode de reproduction a été entrevu en 1834 par Cagnard-Latour et décrit en 1869 par Reess. Les spores ont de 2-6 μ, elles sont

généralement rondes, mais il y en a en forme de haricots (S. Marxianus) ou de chapeau (S. Anomalus).

Le mode de reproduction par spores est celui qui a lieu chez les cellules un peu vieilles ou chez les cellules transportées brusquement d'un milieu riche dans un milieu pauvre. Le milieu pauvre qu'on emploie pour faire cette étude peut être formé de pomme de terre, de carotte ou de plâtre.

Pour être sûr qu'il n'y a pas de matières nutritives entraînées, il faut prendre de la levure parfaitement lavée avec de l'eau sucrée ; soumises à ce régime, les plus vieilles cellules meurent. Quant aux jeunes, elles prennent leurs précautions et la sporulation commence. Voyons en quoi cela consiste.

Formation de la spore. — Le noyau s'allonge en gardant sa membrane et pendant cet allongement, le nucléole se divise en deux sans qu'il reste de filament reliant les deux nucléoles. Le noyau finit en s'allongeant par s'étrangler et par se diviser en deux noyaux ayant leurs membranes et leurs nucléoles.

Environ deux heures après cette scission du noyau, les deux noyaux se rapprochent et se fusionnent. Il en résulte qu'il se forme à nouveau dans l'intérieur de la cellule une sorte de gros noyau différent du premier. C'est un œuf. Ce gros noyau s'allonge à son tour. Le nucléole tend à se diviser en deux, mais ici les deux parties restent unies par un cordon jusqu'à séparation des deux noyaux.

Ceux-ci une fois séparés ne tardent pas à s'entourer d'une couche dense de protoplasma, puis d'une membrane obtenue par dépôt squelettique d'une substance cellulosique, on a 2 spores qui se complètent par la régularisation des fragments du nucléole primitif.

Après la première division de l'œuf, on en a quelquefois une deuxième, une troisième ; on peut en trouver jusqu'à

cinq. Donc on rencontre 2, 4, 6, 8, ou 10 spores, le plus généralement 4 (fig. 41).

Quelquefois on en a trouvé un nombre impair. Cela tient à ce que, lorsque l'œuf s'est scindé en deux, une des parties évolue en spore, c'est-à-dire s'entoure d'une membrane complète et l'autre partie raccordant par soudure sa membrane à celle de la cellule mère, s'entourant par conséquent d'une membrane empruntée en partie à la cellule mère, évolue en conidie.

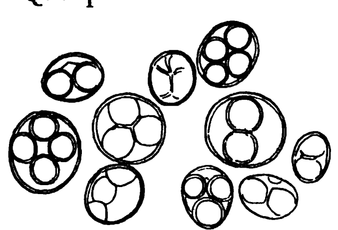


Fig. 41. — Saccharomyces cerevisiæ (spores). D'après Jorgensen.

Remarque. — La sporulation et le bourgeonnement peuvent-ils exister ensemble? — On s'est beaucoup préoccupé de savoir si la sporulation pouvait être parallèle au bourgeonnement. Nous venons d'en citer un cas accidentel.

Hansen a repris récemment cette étude.

Des cellules jeunes parfaitement lavées à l'eau, placées en chambre humide (25°) bien aérée, donnent avant tout un bourgeonnement, puis des spores se forment d'abord dans les cellules mères, et enfin dans les autres après leur bourgeonnement.

Lorsque le milieu déjà si pauvre du début est complètement épuisé, les jeunes cellules ne bourgeonnent plus, et sporulent directement.

Si au lieu de laver à l'eau, on lave les cellules à l'eau saturée de sulfate de chaux, la sporulation a lieu sans bourgeonnement, ce qui prouve que les blocs de plâtre employés dans les laboratoires jouent un rôle dans la sporulation.

Si on étudie des cellules âgées, ou des cellules de voile, il n'y a pas bourgeonnement et cependant certaines cellules

sporulent. L'âge des cellules qui agissent ainsi est fort variable avec les espèces. Hansen a montré qu'un S. Cerevisiæ (I) exige 10 jours et qu'une levure de Johannisberg en exige 4 (1).

Faculté de sporuler. — La faculté de sporuler se produit en définitive lorsque l'on gêne la croissance des bourgeons soit par excès, soit par manque de nourriture, soit par aération, soit par effet de température, celle de 25° étant la plus convenable à la sporulation pour la plupart des espèces.

Il y a une température maxima au delà de laquelle la sporulation ne se fait plus. Pour l'étudier, Hansen se sert de moûts plus constants de composition que le moût de bière ; il a employé parallèlement les 2 bouillons suivants :

I. Peptone, 1 o/o ; glucose, 5 o/o ; phosphate monopotassique, 0,3 o/o ; sulfate de magnésie, 0,2 o/o.
II. Idem avec de la maltose à la place de la glucose.

Après plusieurs cultures dans ces milieux, il a porté sur bloc de plâtre.

Il a trouvé pour les deux sortes de culture les mêmes températures, à savoir :

37° pour le S. Cerevisiæ I.

35° pour le S. Johannisberg.

31° pour le S. Pastorianus.

Il y a d'ailleurs une température optima où la sporulation se fait le mieux.

Abandonne-t-on cette température la sporulation devient plus difficile.

---

(1) Beyerinck cite le fait suivant. En cultivant sur gélose absolument pure, préparée à l'eau distillée, puis en épuisant complètement les cellules, on voit apparaître les spores des cellules mères avant celles des bourgeons. Si on emploie de la gélose impure et de l'eau ordinaire les 2 sortes de spores se produisent ensemble.

Hansen a constaté un fait intéressant :

Il cite deux levures qui toutes deux de 25 à 30° sporulent en 25 heures, et qui à 11°,5 sporulent avec des vitesses tout à fait différentes.

S. Cerevisiæ en 10 jours.

S. Pastorianus en 77 heures.

Levures asporogènes. — La propriété de fournir des spores disparaît avec le vieillissement. Pour y obvier Hansen propose la conservation en solution de saccharose.

La propriété de fournir des spores disparaît également après une série de cultures (et c'est pour cela que dans la nature on rencontre des levures asporogènes).

En général une cellule asporogène redonne des cellules sans spores.

Hansen indique comme moyen de rendre la propriété de la sporulation de faire des cultures répétées dans des solutions nutritives à base de glucose avec transport ultérieur sur milieu pauvre.

Cette méthode est évidemment la seule applicable lorsque toutes les cellules conservées sont asporogènes. Mais il peut arriver que celles-ci soient mélangées à des cellules encore sporogènes. Dans ce cas Beyerinck a cherché la régénération dans une sélection de ces cellules sporogènes.

Il propose une première méthode : tuer toutes les cellules en respectant les spores. La chaleur sèche convient, mais il faut par tâtonnement déterminer pour chaque espèce et la température et la durée. D'ailleurs il semble que cette méthode laisse subsister les plus petites cellules même asporogènes, de sorte qu'il faut toujours choisir entre les deux sortes de cellules et faire une sélection ultérieure. Pour s'aider dans cette opération, l'auteur signale comme caractère distinctif que les colonies issues d'une spore ont un développement tardif, par rapport à celui des colonies végétatives.

La deuxième méthode de Beyrinck consiste à étudier les colonies et à reconnaître celles qui ont des spores pour s'en servir comme de semence. Au point de vue de cette identification, la réaction à l'iode peut être utile ; les spores contiennent de la granulose dans leur paroi et apparaissent en bleu. Les cellules restent incolores ou deviennent brunes à cause du glycogène (ce cas est assez général chez les cellules à spores).

D'autre part les cellules à spores liquéfient la gélatine généralement plus vite que les autres.

Les colonies à spores sont ordinairement d'un blanc pur, les autres étant brunâtres.

Germination des spores. — Les modes de germination des spores sont assez variés suivant les espèces.

Une série de levures ont leurs spores qui germent de la manière suivante :

A l'intérieur de la cellule mère, les spores se gonflent, au point de se serrer les unes contre les autres, elles emprisonnent entre elles des feuillets de protoplasma, et se soudent même souvent, d'où l'aspect réticulé de la cellule mère.

La cellule mère gonfle et s'amincit.

Souvent les spores germent, percent la membrane de la cellule mère, restent engagées dans l'orifice et produisent une sorte de bourgeon à l'extérieur de celle-ci.

Dans ce cas, la cellule mère peut subsister plus ou moins longtemps, de telle sorte que les différentes spores restent liées entre elles pendant quelque temps.

D'autres fois, la cellule mère est résorbée complètement et les spores sont devenues libres avant de germer.

Souvent comme dans le cas du S. Cerevisiæ, du S. Pastorianus, du S. Ellipsoïdeus, 2 spores fusionnent à l'intérieur de la cellule mère et ce n'est que le produit de la conjugaison qui germe comme il vient d'être dit.

Dans le cas du S. Ludwigii et de la levure 74 de Kay-

ser, un fait du même genre se produit. Toutes les spores s'allongent, se touchent, se fusionnent; puis il pousse des tubes qui *se cloisonnent*. Les nouvelles cellules obtenues ne s'arrondissent qu'ensuite.

Dans le Sac. Anomalus, la germination se fait en plusieurs points, de sorte que la spore primitive est garnie de 2-4 bourgeons. Le filet primitif de la spore peut rester ou disparaître.

Vitesse de reproduction de la levure. — Considérons une culture contenant n cellules, supposons qu'après un temps T on en trouve N. Si l'on admet que chaque cellule s'est doublée dans un temps t, il y a eu $\frac{T}{t}$ générations.

Donc $N = n 2^{\frac{T}{t}}$.

Pour une levure de jus de raisin fermentant à 15°, Pasteur a vu qu'en 2 heures 1 cellule en avait donné 8.

Donc $N = 8$.

$n = 1$.

$T = 120'$.

$8 = 1 \times 2^{\frac{120}{t}}$.

Donc $\frac{120}{t} = 3$.

$t = 40'$.

C'est à peu près la vitesse que nous retrouverons pour la scissiparité des bactéries.

Respiration de la levure.

Action de l'air. — La levure a besoin d'air pour vivre ; pour en être convaincu, il suffit de se rappeler l'expérience de Gay-Lussac que Pasteur avait d'abord expli-

quée par une introduction de levure et qui s'explique en réalité par une introduction de levure et d'air.

Expériences de Denis Cochin. — Il prend un tube de Liebig. Dans ce tube il met un bouillon de culture approprié. Il fait passer dans le tube et le bouillon un courant d'acide carbonique pour chasser l'air ; puis il ensemence la première boule avec une levure quelconque.

La fermentation a lieu. Quand elle est bien déclarée, on fait passer une goutte du liquide de la première boule dans la seconde. La fermentation n'a pas lieu dans cette seconde boule. L'explication est la suivante :

Quand on a ensemencé la première boule avec de la levure, celle-ci était aérée. La levure introduite dans la deuxième boule ne l'est plus.

La levure qui a besoin d'un premier contact avec l'air se comporte différemment suivant qu'on lui continue ou qu'on lui supprime l'action de l'air. Cela résulte d'une expérience de Pasteur.

Expérience de Pasteur. — Prenons deux ballons à fond plat de façon à avoir une grande surface.
Mettons dans ces ballons un bouillon de culture ; ensemençons-les et laissons l'un ouvert en fermant l'autre. La fermentation se développe dans les deux ballons.

Dans le ballon ouvert le poids de levure formée est égal au 1/4 du poids du sucre qui s'y trouvait et la quantité d'alcool obtenue est très petite.

Au contraire, dans le ballon fermé il y a peu de levure, mais la quantité d'alcool produite est très grande.

Ces résultats acquis, prenons encore deux ballons, mettons-y de l'eau albumineuse et une levure quelconque. Laissons ouvert l'un des ballons et fermons l'autre.

Dans le ballon ouvert nous trouvons beaucoup de levure et peu d'alcool. La levure s'est surtout multipliée. Dans le ballon fermé, on ne trouve presque rien.

Donc à l'air, la levure vit aux dépens du sucre et aux

dépens d'une matière albuminoïde de la même manière : elle se multiplie. — Au contraire, à l'abri de l'air, elle se multiplie très peu et provoque la fermentation à condition que le milieu en présence soit spécial, soit comme on dit *fermentescible* (qu'il contienne par exemple du sucre et non de l'albumine).

On pense généralement avec Pasteur que la levure qui a subi la vie anaérobie remise en culture aérée reprend la vie aérobie.

Pour Büchner et Rapp, elle éprouverait une certaine résistence, ils considèrent la vie anaérobie comme acquise, sauf dans le cas de culture sur milieu solide.

De l'aération prolongée. — On a beaucoup discuté sur le point de savoir si l'aération utile au début d'une fermentation continuait à l'être pendant la fermentation proprement dite.

Il semble résulter des expériences de Korff que c'est une question d'espèces et d'aliments.

Une aération modérée peut :

Augmenter la multiplication (Saaz et Frohberg) ou la diminuer (Logos) ;

Augmenter l'activité (Saaz et Logos) ou la diminuer (Frohberg) ;

Augmenter le pouvoir ferment (Frohberg et Logos) ou être sans effet (Saaz).

L'oxygène augmente dans tous les cas la multiplication mais quelquefois moins qu'une aération modérée (Frohberg). — Il diminue dans tous les cas l'activité et le pouvoir ferment.

L'hydrogène diminue la multiplication des trois espèces ;

L'hydrogène diminue l'activité (Saaz et Frohberg) ou est sans influence (Logos) ;

L'hydrogène augmente le pouvoir ferment (Frohberg et Logos) ou est sans influence (Saaz).

Au point de vue du milieu, citons par exemple ce fait :

en courant d'air,
- dans l'eau de levure, la multiplication de la Logos est supérieure à celle des autres races.
- dans l'asparagine, la multiplication de cette levure est équivalente à celle de la Frohberg et elles sont supérieures à ce point de vue à la Saaz.

Quoi qu'il en soit, lorsque le courant de gaz est tumultueux, il peut pour une levure et un milieu quelconque avoir une action défavorable par suite des perturbations mécaniques.

Mécanisme de l'oxygénation. — Pouvoir réducteur de la levure. — La facilité de fixer l'oxygène paraît due à une sorte d'oxydase qui imbiberait la surface des cellules. Ce besoin d'oxygène est tellement grand que quand la levure ne trouve pas d'oxygène libre, elle est capable de réduire des corps oxygénés.

Par exemple, en cultivant de la levure à l'abri de l'air en présence de sulfates, on retrouve des sulfures (rendus visibles par les sels de bismuth).

De ce fait, l'*expérience de Schützenberger* est une autre preuve.

Prenons du sang artériel défibriné et faisons-le passer dans un tuyau de baudruche noyé dans un bain de sérum à 35°. Si dans le sérum il n'y a rien, le sang sort comme il est entré. Mais si l'on a mis dans le sérum des cellules de levure, le sang sort noir. La levure a pris l'oxygène du sang artériel.

Alimentation de la levure.

Avant d'entamer ce chapitre, faisons-nous une idée de la composition de la levure. — Les auteurs sont rarement d'accord et cela se comprend, ils n'ont pas employé les mêmes méthodes d'analyse, et ils ont eu affaire à un

produit excessivement variable, puisqu'il est en cours d'évolution et difficile à laver et à sécher.

Composition de la levure. — Voici un tableau de la composition élémentaire de quelques levures. Les nombres sont rapportés à la levure supposée sèche et dépourvue de cendres.

Composition élémentaire de quelques levures.

	LEVURE HAUTE			LEVURE BASSE		
	SCHLOSSBERGER	MITSCHERLICH	WAGNER	SCHLOSSBERGER	DUMAS	WAGNER
Carbone. . . .	50,10	47	45,5	47,93	50,6	52,5
Hydrogène. . .	6,52	6,6	6,2	6,69	7,3	7,2
Azote.	11,84	10,6	9,4	9,77	11,5	9,7
Oxygène et soufre. .	31,59	36,4	38,9	35,61	27,1	30,6

D'après Mitscherlich, il y aurait environ 0,6 de soufre. Il semble que dans les levures basses il y ait moins d'azote que dans les levures hautes. Cela s'expliquerait par le fait que les fermentations basses étant plus prolongées, l'azote cédée par la levure au moût serait plus abondant. La dose des matière azotées dans les levures diminue avec l'âge, peut-être pour la même raison.

Il faut remarquer que ces nombres ne sont pas comparables :

1° Parce que les auteurs ont employé des méthodes d'analyse différentes ;

2° Parce que la composition azotée d'une levure dépend essentiellement du titre en azote du moût de culture.

Composition immédiate de la levure.—Matières hydrocarbonées. — Au point de vue de la composition immédiate, on trouve de la cellulose (ou des celluloses) accumulée surtout dans la membrane, la dose est de 30,37 pour 100 d'après Schlossberger. Mais cela dépend également de l'âge. Duclaux a trouvé dans une levure de 15 ans 6 pour 100 de cellulose et dans la même rajeunie 15 pour 100.

Il y a une matière gommeuse dérivée de la xylose et de la manose.

Le glycogène(1) peut atteindre jusqu'à 10-15 pour 100; la matière grasse est de 5 pour 100 dans les cellules jeunes et de 20 pour 100 dans les vieilles(2): cette matière grasse contient des acides libres et de la cholestérine (les cellules jeunes en contiennent 1/10 du poids des matières grasses, les cellules vieilles 25 pour 100 de ce poids).

Pasteur a constaté qu'une levure parfaitement dégraissée à l'éther, cultivée dans de la saccharose et de l'extrait de levures dégraissées reforme des graisses. Celles-ci proviennent donc du sucre.

Dans la membrane on trouve encore de la lécithine.

Matières azotées. — Les matières azotées des levures sont très diverses.

---

(1) Le glycogène est un aliment de réserve. Sa formation dépend de l'acidité, de l'aération, il peut se former aux dépens des sucres, de la glycérine, de l'acide succinique, de l'acide lactique, de l'asparagine, des peptones, etc. M. Laurent a dosé le glycogène : α) par saccharification sans altérer la membrane; β) en produisant l'autophagie qui détruit le glycogène ; suivant le cas, on détermine le glycogène par différence de poids ou par dosage de l'alcool produit, dont il faut retrancher celui qui provient du milieu.

(2) Duclaux cite une levure de 15 ans qui contenait 50 pour 100 de graisse.

Il y a des albuminoïdes et leurs produits de désassimilation.

Par exemple, Nishimura a indiqué :

Xanthine. . .	0,011	pour 100 de la matière sèche.
Guanine.. . .	0,025	—
Adénine.. . .	0,029	—
Hypoxanthine. .	0,030	—

Il y a également de la tyrosine et de la leucine.

Enzymes. — Il y a de nombreux enzymes dans la levure.

Nous avons déjà parlé de la zymase.

Sucrase. — Il y a de la sucrase dont la nature paraît dépendre des races de levures.

C'est ainsi que la sucrase de la levure haute résiste à 1 ou 3° de température de plus que celle de la levure basse.

Quoi qu'il en soit, de la levure mise dans de l'eau à 65° pendant une heure perd toute activité ; cependant en mettant une levure quelques instants à 100° on retrouve de la sucrase dans l'eau parce que les cellules malades en laissent diffuser et que tout ne se coagule pas.

L'apparition de la sucrase dans les levures dépend bien plus de l'alimentation azotée que de la présence du sucre. C'est ainsi que le moût de bière donne des levures bien plus riches en sucrase que le sucre pur.

D'autre part les substances les plus favorables au développement de la levure ne sont pas nécessairement favorables à la sucrase, tel par exemple le phosphate de chaux.

Maltase. — Un autre enzyme se trouve dans la levure c'est la maltase qui doit invertir la maltose.

Longtemps la maltose a été considérée comme directement fermentescible parce que, pendant la fermentation, on ne peut mettre en évidence la glucose, celle-ci disparaissant aussi vite qu'elle se forme.

Si on essaie d'extraire directement la maltase, elle diffuse si mal qu'on n'obtient rien. Il faut rompre les

cellules avec de la pierre ponce ou du verre pilé, ou bien la sécher lentement à 40°. Dans ces deux cas l'eau en extrait de la maltase (1).

Cette maltase est gênée par le chloroforme, c'est ce qui fait que certaines expériences ont été négatives. On doit la protéger par le toluène.

La maltase paraît détruite par l'alcool ou une température de 50°.

Autres enzymes. — Dans certaines levures on trouve de la lactase capable d'agir sur la lactose, elle est précipitable par l'alcool.

Enfin au moins dans certaines levures il y a une ou plusieurs peptases, car un certain nombre d'entre elles liquéfient la gélatine.

Action protéolytique des levures. — En 1896 Boullanger a signalé la liquéfaction de la gélatine par certaines levures. Artari et Hahn ont signalé la présence d'une peptase.

Will a étudié cette action protéolytique, il a employé

---

(1) Aujourd'hui on prépare la maltase par la méthode de Hill. On prend la levure, on la triture avec de l'eau dans un mortier, on la sèche sur plaque de porcelaine, on la suspend dans une étuve à 40°, puis de quart d'heure en quart d'heure on fait monter la température à 50, 60, 100°. On reste un quart d'heure à cette température. On la met dans une mousseline, on la pend dans un exsiccateur et on la laisse refroidir.

Cela fait on la pèse, dans un flacon fermé; on prend un poids de soude au 0,001 dix fois plus grand que celui de la levure, on ajoute du toluène, on abandonne le tout 5 jours, on filtre au papier, à la bougie. On a un liquide ayant les propriétés de la maltase et contenant 5 pour 100 d'extrait. Ce liquide est très actif, car 20 centimètres cubes d'une solution de maltose à 20 pour 100 (4 gr. de maltose) par 1 centimètre cube du liquide à 30° perd en 40 minutes 0gr,8 de maltose.

En 12 heures, il y en a 9gr,6 de détruit.

La présence de l'eau et de l'alcool fait perdre à ce liquide sa propriété. le chloroforme lui nuit. En chauffant une heure à 120° ou 6 minutes à 105° l'activité ne disparaît pas.

Hill a, à l'aide de ce produit, mis en évidence l'action réversible des diastases.

comme milieu de culture du moût houblonné à 14°,5 Balling additionné de 10 pour 100 de gélatine.

La rapidité de la liquéfaction semble croître avec la température, il y a des levures qui n'ont pas liquéfié la gélatine après un an à 13°, tandis qu'à 20° elles ont mis de 18 à 168 jours.

Les différentes espèces agissent différemment et l'ordre des races n'est pas le même à toutes les températures, le plus souvent ce sont les levures hautes qui viennent en tête.

Ordinairement le moût non houblonné, se liquéfie moins vite.

Si on ensemence la gélatine fondue, au lieu de l'ensemencer par piqûre, la liquéfaction est plus rapide, et même très rapide quelle que soit la température.

Le phénomène de la liquéfaction de la gélatine part de la couche la plus riche en colonies, couche d'autant plus éloignée de la surface que la levure est plus ou moins avide d'oxygène. La couche de gélatine sous-jacente se liquéfie, les levures des colonies tombent au fond de la cavité ainsi formée et agissent sur une nouvelle couche de gélatine avec d'autant plus de facilité que l'aération produite par la dislocation de la gélatine due aux efforts combinés de la liquéfaction et de la fermentation amène une nouvelle multiplication de cellules.

Matières minérales. — La composition minérale de la levure est très variée.

Voici les nombres de différents auteurs : cendres.

Levure haute. —	Schlossberger. . . .	2,5 o/o
	Mitscherlich. . . .	7,7 o/o
	Wagner.	2,5 o/o
Levure basse. —	Schlossberger. . . .	3,5 o/o
	Mitscherlich. . . .	7,5 o/o
	Wagner.	5,3 o/o

Les cendres sont surtout riches en acide phosphorique

(50 pour 100 de leurs poids) ; ensuite vient la potasse très voisine de 40 pour 100.

La magnésie (4 pour 100), la chaux (2 pour 100), la silice et la soude (chacunes 1,5 pour 100), l'acide sulfurique (1/2 pour 100), l'oxyde de fer et le chlore (ensemble 1 pour 1000) complètent la série.

Ces nombres ne sont qu'approximatifs.

Revenons à l'alimentation des levures.

Alimentation des levures. — Il faudra évidemment des sels s'incorporant dans les cellules et retrouvés à l'état de cendres ; il faudra encore des matières capables de produire les albuminoïdes et leurs dérivés, de fournir la cellulose, les graisses, le glycogène, éléments de construction des cellules, et enfin d'assurer la dépense d'entretien ; il faudra de plus les éléments fermentescibles sur lesquelles la zymase doit agir.

Il résulte de tout cela qu'on doit assurer à la levure une alimentation saline, azotée, hydro-carbonée.

1° **Alimentation saline.** — Aidé par l'étude des cendres on a déterminé les sels les plus favorables à la levure. Ce sont le phosphate de potasse, le sulfate de chaux et le phosphate de magnésie. La chaux peut cependant faire défaut. Les liqueurs Pasteur, Cohn, Laurent, Mayer décrites au chapitre dès cultures sont très favorables aux levures.

Très souvent on fait multiplier les levures dans des milieux où l'on a négligé de mettre des sulfates. Néanmoins la levure se multiplie. Cela tient sans doute à ce que dans ces milieux de culture on introduit du sucre qui contient toujours une petite quantité de soufre. Mais il résulte d'expériences comparatives faites par Stern qu'une levure cultivée en présence de cendres de levure exemptes de sulfate, détruit moins de sucre que dans un mélange contenant des sulfates.

Alimentation azotée. — Les nitrates ne sont pas suffisants. L'ammoniaque peut servir d'aliment. Pasteur(1) a cultivé des levures dans des liqueurs ammoniacales. Il a constaté que l'ammoniaque disparaît, qu'il n'y a pas dégagement d'azote et que les moûts de cultures contiennent plus de matières albuminoïdes qu'au début.

On explique cela en disant que la levure se nourrit d'ammoniaque, forme des matières albuminoïdes qu'elle élimine en partie et rend l'ammoniaque au milieu précisément sous forme de matières albuminoïdes.

Les amides, par exemple l'asparagine, sont des aliments favorables. Les matières albuminoïdes sont d'autant plus favorables qu'elles sont plus rapprochées par leur composition de l'acide urique. La diastase doit par conséquent être un aliment favorable.

On s'est demandé si la levure ne détruit pas la diastase, ce qui serait fâcheux, car la saccharification des moûts amylacés ne se complète qu'à la condition que la diastase reste dans le moût. La diastase est bien en effet un aliment de la levure, mais en présence des amides et d'autres corps elle n'est pas absorbée.

Au point de vue de l'alimentation azotée, nous pouvons encore citer une expérience de M. Duclaux.

Dans une fermentation rapide, où le poids de levure a très peu varié, 40 grammes de sucre ont disparu en présence de 1 gramme de tartrate d'ammoniaque.

---

(1) Voici le détail de cette expérience :

On fait dissoudre 200 grammes de sucre candi, 1gr,5 de sulfate d'ammoniaque, 1gr,5 de cendre de levure, 1 gramme de bitartrate de potasse, 0gr,5 de bitartrate d'ammoniaque. On ensemence par une trace de levure.

Après 13 jours de fermentation on a 2gr,56 de levure, il n'y a plus d'ammoniaque.

La levure sèche a passé du poids 2gr,501 et de la teneur 8,63 o/o d'azote
au poids 2gr,236 et à la teneur 6,36 o/o —
Donc la levure est passée de 0,215 d'azote à 0,148 tandis que le liquide
passait de 0,152 d'azote à 0,216 { dont 0,170 en azote albuminoïde et 0,045 en azote ammoniacal.

Ce qui prouve que l'azote ammoniacal a presque disparu, et que l'azote total de la levure a diminué.

L'azote d'une levure dépend du moût. — Cette quantité totale d'azote assimilé dépend du moût non seulement au point de vue de la richesse de celui-ci en azote, mais encore au point de vue de sa richesse saline. Si les éléments minéraux sont en proportion normale, il n'y a que les moûts très faibles en azote qui donnent après culture un poids de levure plus faible ; les éléments minéraux augmentant, le poids de levure croît, sauf si l'azote du moût est très faible.

Si les éléments minéraux sont en quantité normale, les moûts très pauvres en azote fournissent à la levure une quantité d'azote assimilée plus faible (1) que dans les moûts ordinaires ou riches. Une augmentation de la richesse saline augmente l'azote total assimilé seulement si le moût est d'une richesse moyenne en azote. Est-il pauvre ou riche, l'effet est peu marqué. D'ailleurs l'effet des éléments minéraux paraît surtout dû aux sulfates.

Les éléments minéraux étant en quantité normale, la dose d'azote de la levure est constante si le moût a plus de 0,5 pour 100 d'azote. Elle diminue et est proportionnelle au titre du moût si celui-ci est compris entre 0,5 et 0,2 pour 100. Enfin elle devient constante et petite lorsque le titre du moût est inférieur à 0,2 pour 100.

L'assimilation de l'azote dépend des races de levure.

---

(1) Il s'agit ici de l'azote assimilé, plus haut du poids de levure, et plus bas du titre en azote de la levure.

Kayser a fait voir que la levure basse prend toujours moins d'azote au moût que la levure haute.

Influence de la nature des aliments azotés sur la nutrition de la levure. — Il y a des variations dues à la variation des aliments azotés.

Ces variations dépendent d'ailleurs de la nature des levures.

Variations causées sur une même levure. Expériences de Lange. — La levure cultivée en milieu de peptone se dépose en grumeaux mélangés à une impureté soluble dans la soude, tandis que cultivée en milieu d'asparagine, elle se dépose pulvérulente et pure. C'est un effet de coagulation de la peptone par l'alcool qui dépend d'ailleurs de l'homogénéité de la peptone et de la température.

En employant comme peptone la partie non précipitée par de l'alcool, il n'y a pas de différence avec l'asparagine.

Lange, sur des milieux formés de 500 centimètres cubes de saccharose à 10 pour 100, 2 grammes de phosphate de potassium et $0^{gr},5$ phosphate de magnésie et d'une des doses d'azote suivantes

I.	8^{gr} peptone.			avec la levure de la brasserie expérimentale de l'Institut de Berlin.
II.	6^{gr}	—	+ 2^{gr} asparagine.	
III.	3^{gr}	—	+ 5^{gr}	—
IV.	0^{gr}	—	+ 8^{gr}	—

n'a pas trouvé de différence dans la marche de la fermentation.

Mais une autre levure de brasserie, cultivée avec difficulté dans les mêmes milieux a donné avec l'asparagine des formes allongées vacuolées.

La même levure cultivée dans les milieux précédents additionnés de leur volume de moût de bière, a donné les mêmes résultats, et la levure à l'asparagine dégageait en 1 heure 1/2, 344 centimètres cubes de CO^2 tandis que la levure à la peptone n'en donnait que 210.

Variations sur différentes races de levure. — D'une série

d'expériences de comparaisons faite entre les 3 levures Logos, Saaz, Frohberg, cultivées soit à l'asparagine, soit à la peptone, Korff a tiré les conclusions suivantes qui montrent l'influence de la nature des aliments azotés.

En 4 jours la levure Logos a donné le maximum de cellules et parmi les trois sortes de culture, c'est l'eau de levure qui en a donné le plus (2862 cellules en 4 jours).

C'est la levure Saaz qui en présence de l'asparagine en a donné le minimum (464).

Au point de vue du rendement en alcool, l'alimentation joue un rôle.

En présence d'asparagine la Saaz et la Frohberg donnent un rendement légèrement meilleur que la Logos.

Les trois levures donnent un meilleur rendement avec l'asparagine qu'avec l'eau de levure ou la peptone.

Il faut bien remarquer que tout ceci est particulier aux trois levures citées, avec d'autres les résultats seraient différents.

Les produits formés par l'assimilation de l'azote dépendent et des races et des aliments azotés employés. — C'est ce qui arrive en particulier à la sucrase.

Au point de vue de l'inversion par la sucrase, dans un milieu de culture fait avec de l'eau de levure ou avec de l'asparagine, les levures de brasserie Saaz ou Frohberg produisent l'inversion du sucre en 4 jours. Dans le même milieu, la levure Logos demande plus de 4 jours pour produire l'inversion.

Si nous prenons la peptone comme milieu de culture c'est l'inverse qui se produit.

Alimentation hydrocarbonée. — Il y a des corps qui ne sont pas propres à l'alimentation de la levure, quel que soit le mode de vie de celle-ci.

Ce sont : l'alcool, l'aldéhyde, l'éther, les acides gras, un certain nombre d'amides au point de vue hydrocarboné, la cellulose.

Pour la vie aérobie un grand nombre de substances conviennent à l'alimentation hydrocarbonée de la levure. Ce sont tous les acides-alcools tels que les acides tartrique, citrique, malique, les glucosides, les dextrines, la glycérine, les sucres, les matières albuminoïdes.

Pour la vie anaérobie, les matières albuminoïdes ne conviennent plus.

Il n'y a guère que les sucres et les dextrines.

Spécificité d'action. — Mais il faut remarquer qu'il y a une spécificité d'action de chaque levure pour chaque sucre et cela tient, sans doute, à ce que les levures ne contiennent pas toutes les diastases nécessaires pour invertir tous les sucres dédoublables, ni toutes les zymases attaquant tous les sucres.

Cette spécificité d'action a été admise d'une manière absolue à la suite du travail de Fischer sur la maltase ; les difficultés de la mise en évidence de cet enzyme après avoir servi aux adversaires de la doctrine de Fischer se sont retournées contre eux lorsque celui-ci eut résolu la question.

Comme exemple net de spécificité on peut citer les cas suivants :

La mélibiose ne fermente pas par les levures hautes, mais fermente par les levures basses (d'où une méthode d'analyse des levures).

La levure Pombe fait fermenter une achroodextrine.

La levure Apiculatus a la propriété de ne pas faire fermenter la galactose (méthode d'isolement de la galactose mêlée à de la glucose).

La levure Roux ne fait pas fermenter la saccharose et détruit la glucose (méthode d'isolement de la saccharose).

Expériences de Dubourg. — Cependant la doctrine de la spécificité absolue doit tenir compte des expériences de Dubourg. Celui-ci a, en effet, depuis peu, effectué une

série d'expériences qui montrent que la spécificité n'est pas absolue, qu'elle est contingente, qu'elle peut se modifier par acclimatation.

Voici son expérience :

Il prend un moût de culture très riche en matière azotée (eau de levure à 25 pour 100).

Il y met 5 pour 100 de saccharose, et ensemence une levure analogue à celle de Roux ; rien ne se forme ; de même, si on opère en présence de $0^{gr},5$ pour 100 de glucose.

Mais opère-t-on en présence de 5 pour 100 de glucose, que l'on constate d'abord la disparition de celle-ci puis celle de la saccharose.

Si, lorsque tout le sucre a disparu, on décante la levure, et qu'on la lave parfaitement, celle-ci est capable de faire fermenter un moût de saccharose.

Que se passe-t-il dans ce phénomène ? La levure vivant d'abord aux dépens de la glucose quand il y en a une dose suffisante s'acclimate peu à peu à la saccharose et devient capable de la faire fermenter.

Les sucres tels que la galactose, la raffinose, la tréhalose (1) qui sont assez difficiles sur le choix des levures fermentent dans ces conditions.

Seule la lactose résiste.

A propos de la levure de la galactose, M. Dienert a montré que ces phénomènes d'acclimatation n'ont lieu que si on gêne le bourgeonnement par un fort ensemencement ou par la présence du toluène. Avec un ensemencement léger l'acclimatation n'a pas lieu ; chose curieuse, la levure de galactose ayant acquis l'acclimatation la perd en présence de la lactose que cependant elle n'atta-

(1) M. Bau pense que la fermentation difficile de la tréhalose tient à ce que la tréhalose n'est pas diffusible.

que pas. En présence d'eau, l'acclimatation se maintient mais avec une exagération de l'effet nuisible de l'alcool.

Si on prend une levure de lactose, elle est acclimatée à la galactose mais perd cette propriété par passage sur saccharose.

Inégal degré de fermentescibilité. — Mais non seulement la nature de la race de levure influe sur la fermentescibilité du sucre, mais le degré de fermentescibilité est variable.

On a basé des méthodes pratiques d'étude des levures sur ce fait, c'est-à-dire sur la mesure de sucre restant.

Le sucre restant dépend,

1° *de la température*, ainsi

À 25° la levure 2 de Kayser a laissé $2^{gr},7$ de sucre.
— 32 — 2,89 —

A 35° la 1re de ces levures a laissé $115^{gr},6$ de sucre et la 2e, $36^{gr},66$.

2° *de l'acidité*, ainsi la levure n° 7 de Kayser

Avec $7^{gr},5$ d'ac. tartrique par litre a laissé 86,8 de sucre.
1,9 — 51,1 —
Avec 6,7 d'ac. malique par litre a laissé 46 —
1,67 — 40,9 —

En brasserie, pour caractériser la levure, on emploie souvent l'atténuation apparente. Celle-ci dépend de la densité primitive, du sucre restant, de l'alcool formé.

Mais il faut remarquer que cette atténuation dépend non seulement de la race, mais aussi de la température, de l'aération, de l'acidité, de la nature de l'acide et de la quantité de levure.

Van Laer prétend cependant que l'atténuation limite (maxima) ne dépend que de la race.

Sucres en mélanges.— Nous avons vu le mode d'action des levures sur les différents sucres. Nous allons parler des sucres en mélange. Ils ne fermentent pas avec la même vitesse.

En 1847, Dubrunfaut avait en effet constaté que, si l'on fait agir de la levure sur du sucre inverti et si l'on suit le pouvoir rotatoire au fur et à mesure de la fermentation, la rotation reste la même au début, puis se rapproche ensuite de zéro.

Il expliqua ce fait en admettant que dans le sucre inverti devait se trouver un isomère inactif qui fermente le premier. Tant que ce composé n'était pas détruit, il n'y avait aucune raison pour que le pouvoir rotatoire diminuât. Lorsque cet isomère était détruit, le sucre inverti tendait à disparaître, donc la rotation devait se rapprocher de 0°.

Aujourd'hui on sait que la glucose et la lévulose tendent à fermenter d'abord avec la même rapidité puis que la lévulose prend le pas.

Cette prépondérance est relative et dépend de la race de la levure, du milieu et de la température. On connaît par exemple une levure provenant de la fermentation des lies de vin de Sauterne qui fait disparaître complètement la lévulose avant d'attaquer la glucose. Le Pastorianus donne le pas à la glucose. Au point de vue du milieu où se trouve la levure, citons par exemple, la levure Saaz qui en présence d'asparagine fait fermenter plus rapidement la glucose et qui en présence de peptone fait au contraire disparaître plus vite la lévulose.

L'effet produit par une levure sur un mélange de sucres dépend également de la température à laquelle elle agit. Un changement de température peut en effet transposer l'effet.

Par conséquent les sucres en mélange ne fermentent pas avec la même vitesse. De plus ils fermentent autrement que s'ils étaient seuls.

Par exemple la levure Pombe produit une atténuation de 84 dans du moût de bière. La levure Logos en produit une de 93. Le mélange possède une atténuation de 97,3.

Glucose et galactose. — Le cas du mélange de glucose et de galactose est intéressant.

La galactose qui ne fermente pas par l'apiculatus, fermenterait en présence de la glucose par entraînement. Or certains auteurs ayant purifié de la galactose annoncèrent qu'elle ne fermentait réellement pas et que ce qui avait trompé les premiers auteurs était la fermentation des impuretés.

D'après ce que nous savons de l'acclimatation des levures, il est probable que les différents auteurs ont également raison, mais ils n'ont pas opéré dans des conditions identiques, les uns produisant l'acclimatation, les autres n'y arrivant pas.

Autophagie de la levure. — Prenons une liqueur sucrée et introduisons une levure en quantité telle que son poids soit inférieur aux 4/10 du poids du sucre de la liqueur. Laissons fermenter. Pendant la fermentation il se dégage du gaz carbonique et il se forme de l'alcool qu'on retrouve à la fin de l'opération et qui sont au prorata du sucre détruit.

Répétons la même expérience en prenant un plus grand poids de levure et le même poids de sucre que précédemment. Il se dégage 3 fois plus de gaz carbonique que dans la première expérience et, à la fin de la fermentation, on retrouve un poids d'alcool légèrement plus grand. Si l'on arrête la fermentation lorsqu'on a le volume voulu de gaz carbonique, il n'y a plus de sucre et pourtant la fermentation continue.

Si l'on étudie le liquide de culture on trouve des produits azotés qui sont des produits de désassimilation des albuminoïdes ; la levure séchée diminue de poids, elle contient surtout moins de carbone dans la partie soluble, son titre en azote et en glycogène a diminué.

On ne peut expliquer ce phénomène que de la façon suivante. Dans la première expérience, la levure en quan-

tité normale par rapport au poids du sucre a fermenté normalement. Dans la deuxième expérience la levure qui était en excès, pour ne pas mourir de faim, a dû manger ses aliments de réserve, entre autres la glycogène et les matières azotées. C'est l'autophagie.

On peut également produire l'autophagie en abandonnant de la levure dans de l'eau.

Lindner a dans ces derniers temps repris l'étude de l'autophagie, il a constaté, ce qui est d'ailleurs naturel, que les levures riches en glycogène, telles que les levures basses, donnent plus d'autophagie.

Il a vu que certains sels tels que le phosphate disodique, les chlorures, les sels ammoniacaux, les sulfates de potasse, de chaux, de manganèse empèchent l'autophagie, tandis que les sulfates de zinc, de magnésie, de fer, de soude, le phosphate monopotassique l'activent.

L'eau distillée gêne au début; enfin l'autophagie se prolonge pendant toute la durée de la conservation, mais elle s'atténue de plus en plus.

La conséquence de ceci, c'est qu'en distillerie, quand on doit travailler par coupages et posséder pour ainsi dire une population éternelle de levures, il faut éviter de la placer dans les conditions de la deuxième expérience. Si au contraire on fait pour chaque cuve un pied de cuve nouveau, on a intérêt à la fin des opérations à produire l'autophagie qui augmente le rendement en alcool.

Chaleur et levures.

Kayser a étudié avec détails l'action de la chaleur sur les différentes levures.

Il a trouvé des résultats différents suivant lès races, par exemple pour les :

	HUMIDES		SÈCHES	
	levure	spores	levure	spores
Levure de St-Émilion.	65	65-70	95-105	115-125
Levure Pastorianus. .	50-55	60	100-105	115
Levure Pale ale Bass.	60	65-70	95-105	115-125

sont les températures mortelles.

Les levures vieilles supportent 5-10° de plus à l'état humide et 5-10° de moins à l'état sec.

Les levures issues de bourgeons n'ont pas la même résistance que celles provenant de spores.

D'ailleurs longtemps avant d'atteindre ces températures mortelles, les levures souffrent de l'autophagie. Ainsi les levures de distillerie au delà de 32-33° subissent ce phénomène.

Les levures résistent à — 100°, mais ne provoquent plus la fermentation dès —8°.

En dehors de ces températures extrêmes, il y a pour chaque race de levure une température optimum.

C'est ainsi que les levures de distillerie aiment les températures de 20-25°, celles de vin de 25-30° et même 35°, celles de bière de 5 à 10°, etc.

Autres agents physiques.

Action de la pression sur les levures. — La fermentation dans un vide relatif est moins active. La levure résiste à 800 atmosphères (si dans l'expérience Büchner elle est détruite à 500, c'est qu'elle est mélangée à du sable).

Action de la lumière. — Suivant Dumas la lumière est favorable aux fermentations, suivant Kny elle est indifférente. Il ne faut pas oublier que Duclaux a montré qu'à la lumière les corps gras se saponifient ce qui

est nuisible aux fermentations et que les sucres en liqueurs alcalines se transforment en formiates, ce qui n'a pas d'intérêt pratique les moûts étant toujours acides.

Dans la pratique de la distillerie la cuverie est toujours éclairée, il se peut que ce soit une vérification empirique de la bonne action de la lumière ; mais il est évident que la commodité intervient pour beaucoup dans la clarté des cuveries.

Action de l'électricité. — Son action paraît nulle ; mais il ne faut pas oublier que les électrolyses modifient chimiquement les moûts.

L'étude de cette action de l'électricité est difficile, car on ne peut guère faire circuler les courants dans tous les coins des vases.

Dégagement de chaleur pendant la fermentation.

De même que pour les moisissures, une partie du sucre brûle pour fournir la chaleur nécessaire à la complication de la molécule d'une autre fraction du sucre qui va constituer les matériaux de la levure qui se forme. — Mais cette constitution de nouveaux éléments absorbe ou dégage de la chaleur de telle sorte qu'on ne connaît ni la valeur ni le signe de la quantité de chaleur représentant la dépense de construction.

A côté de cette dépense il y a la dépense d'entretien qui produit de la chaleur, et comme elle dure infiniment longtemps par rapport à l'autre dépense qui n'est que momentanée, elle donne son signe à la dépense de chaleur résultante des 2 opérations. Or même lorsque cette quantité de chaleur est minima, c'est-à-dire dans la vie anaérobie, elle est positive, une fermentation est donc toujours exothermique.

Berthelot a calculé de la façon suivante le dégagement de chaleur de la fermentation.

Il a pris l'équation de décomposition et a fait la balance de la quantité de chaleur de formation des corps primitifs et de la quantité de chaleur de formation des corps résiduels en tenant compte de l'évaporation de l'eau. Il a considéré la différence comme la quantité de chaleur produite par la décomposition du sucre sous l'influence de la cellule. Mais dans la pratique le calcul est impossible car on ne connaît pas la composition exacte de la cellule. On néglige les éléments de celle-ci et on s'en tient aux produits extérieurs.

En prenant l'équation de Gay Lussac pour définir ces produits, on trouve 33 grandes calories par molécule-gramme de sucre détruit et 27 grandes calories si l'on prend l'équation de Pasteur.

On a cherché à faire des mesures expérimentales, en réalité une mesure précise est impossible : en effet, la fermentation est une opération longue. Pour mesurer la quantité de chaleur dégagée, il faudrait employer un calorimètre et nous aurions à tenir compte de la perte due au rayonnement, ce qui serait impossible dans ce cas prolongé. Si l'on fait la mesure pendant un temps partiel, les résultats trouvés n'ont pas non plus une grande valeur. Pendant la fermentation, outre l'acide carbonique et l'alcool, il se forme d'autres produits qui prennent naissance les uns au début, les autres à la fin de la fermentation et les quantités de chaleurs mesurées à un moment donné ne sont pas, à cause de cela, proportionnelles à la durée de l'opération.

Empruntons à M. Duclaux une réflexion intéressante.

La levure d'après l'équation $C^6H^{12}O^6 = 2C^2H^6O + 2CO^2$ dégage 33 calories.

Une moisissure en vie aérobie brûle le sucre d'après l'équation $C^6H^{12}O^6 = 6CO^2 + 6H^6O$ avec un dégagement de 673 calories.

Donc dans ce cas il faut que la levure détruise 20 fois

plus de matière que la moisissure pour faire le même travail.

Si la moisissure est en vie anaérobie, et si elle produit 5 pour 100 d'alcool, le dégagement de chaleur est de 641 calories, il faut dans ce cas que la levure détruise 19 fois plus de sucre que la moisissure.

Conditions de l'emploi de la levure comme ferment.

1° ***Air.*** — Le milieu doit être aéré au début ; plus tard l'aération doit être mesurée d'après la nature de la levure ; un excès d'oxygène ralentit toujours la fermentation.

2° ***Quantité.*** — La levure devant agir comme ferment doit être mise en quantité déterminée (1), mais il n'en faut pas mettre trop car les cellules se gênent mutuellement, profitent moins du milieu, se multiplient moins vite et au bout de quelque temps la fermentation est moins avancée que si on avait mis une quantité de levure moins grande. La dose de levure à employer dépend évidemment de la nature du moût et en particulier de la qualité et de la quantité du sucre qui s'y trouve. En distillerie on estime à 3 pour 100 du poids de la saccharose le poids de levure de bière qu'il faut employer ; cela correspond, si l'on compte en matière sèche de levure, à 6 ou 7 pour 1000 du poids du sucre.

Au point de vue de la nature du sucre, on peut citer l'expérience suivante :

Prenons un bouillon artificiel et faisons-en deux parts. Dans la première mettons de la glucose et dans la seconde de la saccharose. Ensemençons les deux moûts avec la même quantité d'une certaine levure.

---

(1) On peut dire que la durée de la fermentation est plutôt proportionnelle à la quantité de sucre.

La glucose disparaît dans un temps moitié de celui que met la saccharose, donc pour produire avec la saccharose la même fermentation qu'avec la glucose il faut un poids différent de la levure choisie.

Cela ne touche guère la distillerie qui invertit toujours, au moins partiellement, la saccharose.

3° ***Alimentation et température.*** — Elles doivent être appropriées à la nature de la levure.

4° ***Pression.*** — Quand la pression sur le moût est inférieure à la pression atmosphérique, la fermentation va moins bien. Il vaut mieux opérer à la pression ordinaire.

5° ***Eau.*** — Pour que la fermentation s'effectue, il faut que le sucre soit en présence d'au moins 40 pour 100 d'eau dans le moût. La fermentation est un phénomène résultant d'une végétation et il y a entre la levure et le milieu nutritif des échanges qui doivent se faire par diffusion. S'il n'y a pas une quantité d'eau suffisante, la diffusion se fait mal. S'il y a moins de 13 pour 100 d'eau la fermentation s'arrête.

6° ***Limite de l'alcool.*** — La quantité d'alcool dans le bouillon de culture ne doit pas être trop grande. Cette quantité dépend de la race de la levure.

La limite maximum probable d'alcool est 16 pour 100.

7° ***Acidité.*** — Un excès d'acidité ou d'alcalinité ralentit ou arrête les fermentations ; l'acide cyanhydrique arrête la fermentation sans toucher à l'inversion.

8° ***Sels.*** — Certains sels comme le carbonate de potasse, le bisulfite de soude, sont sans action. D'autres, comme le bisulfite de potasse, les iodures, les arsénites, le borax, retardent l'inversion sans agir sur la fermentation. D'autres retardent seulement la fermentation. Ce sont par exemple les chromates, les chlorures de sodium et d'ammonium. D'autres enfin arrêtent l'inversion et la fermentation comme par exemple le cyanure de potassium, le sulfure de sodium.

Les antiseptiques peuvent retarder et même arrêter la fermentation.

A petite dose, les antiseptiques activent la fermentation tandis qu'ils l'arrêtent en endormant ou en empoisonnant la cellule lorsqu'on les emploie à haute dose.

Nous reviendrons sur cette question des antiseptiques.

Conservation de la levure.

On ne peut la conserver dans un bouillon de culture, car à un moment donné se produirait l'autophagie (1). Voici comment on procède. On ensemence un bouillon de culture de la levure qu'on veut conserver. Au bout de quelque temps, avant que l'autophagie se produise, on ensemence un second bouillon de culture avec le premier et ainsi de suite. Dans ces conditions on peut conserver la levure très longtemps.

Mais on peut opérer autrement. Il suffit de mettre la levure dans des milieux relativement pauvres. N'ayant pas d'aliments, elle décline mais ne meurt pas.

Comme milieux pauvres, on a employé :

De l'eau sucrée pure à 10 pour 100, du moût de bière, de l'eau distillée, du moût gélatineux, du papier filtre, du coton, etc. Le meilleur est l'eau sucrée. L'eau pure provoquerait une diffusion à travers les cellules et il en résulterait un étiolement plus grand.

Certains distillateurs conservent d'une campagne à l'autre leur levure en la malaxant avec de l'amidon et en l'abandonnant dans un endroit sec.

---

(1) Cependant M. Duclaux a pu régénérer des levures conservées en moût de bière pendant 22 ans; il ne faut pas que les albuminoïdes s'altèrent. D'ailleurs les levures vieilles de 14 ans et régénérées n'ont plus duré que 9 ans.

La vérité est qu'il faut avant tout sécher la levure si on veut la conserver autrement que par des cultures répétées. L'idée de l'amidon n'est pas la seule, on a préconisé le noir, le plâtre, la farine de riz, la fécule, le houblon, etc.

Hansen sèche de petites quantités de levure dans du papier buvard ; procédé que **Reinke** a amélioré.

La levure lavée et pressée est enveloppée dans deux feuilles de papier de soie stérilisées à 135° pendant trois heures.

On la porte alors dans une chambre à atmosphère humide et exempte de poussière où on l'enveloppe dans du papier blanc ordinaire saupoudré d'acide borique.

Le paquet est alors pressé entre des plaques d'amiante stérilisées et séchées par un courant d'air froid et lavé à l'acide sulfurique.

La pression doit être rapide et faite à température assez basse pour que l'échauffement ne porte pas la levure au delà de 44°.

Ce séchage laisse 30 pour 100 d'eau dans la levure.

Les paquets sont alors mis dans des boîtes de conserve contenant du plâtre stérilisé à 150° ; on soude ensuite ces boîtes.

Kieselwalter lave la levure pressée avec de l'alcool, la represse, la sèche dans un courant d'air.

Dans tous ces procédés, le matériel doit être absolument stérilisé et la levure sèche doit être enfermée d'une manière hermétique.

On a proposé aussi de malaxer les levures avec des matières fermentescibles de manière à former une masse compacte.

Dans ce cas le réveil de la levure est plus facile que dans le cas des simples absorbants d'eau, mais les chances de contamination sont plus grandes.

Produits formés pendant la fermentation.

Nous ne parlerons ici que des produits trouvés en dehors de la cellule, les autres ayant déjà été étudiés.

Nous avons d'abord de l'acide carbonique et de l'alcool. Si on fait la somme des poids de ces deux produits on trouve que cette somme ne représente environ que 95 pour 100 du sucre du liquide. Il y a donc 5 pour 100 de sucre décomposé d'une façon particulière. Ils sont représentés par un grand nombre de corps. On trouve :

La glycérine $CH^2OH — CHOH — CH^2OH$. Pour la doser on fait un extrait sec du liquide alcoolique. On place cet extrait dans le vide. La glycérine ne s'évapore pas.

L'acide succinique $COOH — CH^2 — CH^2 — COOH$. Il accompagne toujours la glycérine. On peut le séparer en se débarrassant d'abord de l'acide oxalique au moyen de la chaux en liqueur étendue. On extrait ensuite l'acide succinique à l'état de sel d'argent.

Le rapport du poids de l'acide succinique et de la glycérine est presque constant. Le poids d'acide succinique est d'environ 1/5 de celui de la glycérine. Peut-être ces 2 corps prennent-ils naissance ensemble d'après la formule

$$8C^6H^{12}O^6 + 6H^2O = 4CO^2 + 2(C^4H^6O^4) + 12(C^3H^8O^3) + O^2$$

L'acide lactique $CH^3.CHOH.COOH$. C'est peut-être le produit d'une fermentation lactique.

A côté de ces acides s'en trouvent d'autres qui appartiennent à *la famille des acides gras.*

On trouve :

L'acide formique $H — COOH$.

L'acide acétique $CH^3 — COOH$.

L'acide valérianique $C^4H^9 — COOH$.

Ces acides paraissent avoir deux origines.

1° Ils peuvent provenir de l'oxydation de l'alcool ordinaire et des alcools supérieurs qui se trouvent toujours à côté de l'alcool ordinaire.

2° Ils peuvent également provenir de la vie de la levure. La levure se nourrit de matières azotées et rend des matières albuminoïdes plus ou moins décomposées. Or, dans les matières albuminoïdes se trouvent toujours des résidus d'acides gras amidés qui, sous l'influence de l'eau, donnent les sels ammoniacaux correspondants.

A côté des acides cités on trouve aussi des alcools supérieurs.

L'alcool propylique $CH^3 - CH^2 - CH^2OH$ liquide bouillant à 97°.

L'alcool isopropylique $CH^3 - CHOH - CH^3$ liquide bouillant à 85°.

L'alcool isobutylique primaire $CH^3 - CH(CH^3) - CH^2OH$ liquide bouillant à 107°.

Les alcools amyliques.		
	L'alcool amylique primaire non normal, non actif (méthyl 3, butanol 1).	$CH^3 - CH(CH^3) - CH^2 - CH^2OH$
	L'alcool amylique primaire non normal, mais actif (méthyl 2, butanol 1).	$CH^3 - CH^2 - CH(CH^3) - CH^2OH$
	L'alcool amylique secondaire actif (méthyl 1, butanol 1)	$CH^3 \cdot CH^2 \cdot CH^2 \cdot CHOH \cdot CH^3$

Ces trois liquides bouillent à 132°, 127°, 119°.

On trouve encore des alcools plus complexes, comme l'alcool caproïque (en C^6), l'alcool œnanthylique (en C^7), l'alcool caprylique (en C^8), etc.

Comment se forment ces corps ?

M. Lindet a constaté que ces alcools se forment surtout à la fin des fermentations et quand la température est élevée. Pour expliquer leur formation, on a émis deux hypothèses.

Ils peuvent être dus non à la levure, mais à des bactéries s'introduisant dans le moût. La levure étiolée et la température élevée sont en effet de bonnes conditions pour le développement des bactéries.

Cette hypothèse peut paraître d'autant plus vraisemblable que l'on a fait des cultures pures à températures élevées de levures déjà acclimatées à des milieux riches en alcools supérieurs. Comme on n'a trouvé dans ces cultures pures aucune trace d'alcool amylique, il semble qu'on doive en tirer la conclusion suivante : quand un moût contient de l'alcool amylique, c'est que les cultures n'étaient pas pures.

Mais voici une expérience qui permet d'émettre des doutes sur l'explication précédente.

Faisons une culture de cellules allongées et ramifiées provenant d'un voile et ensemencées dans du moût de bière. Si nous opérons à basse température, nous n'obtenons pas d'alcool amylique. Si nous opérons à température un peu élevée nous en trouvons. Ici, il ne s'agit plus d'infections par les bactéries. Il est donc vraisemblable d'admettre que la levure proprement dite est capable de donner de l'alcool amylique par elle-même, ce qui n'empêche pas que les alcools supérieurs peuvent aussi provenir de bactéries étrangères.

On trouve encore dans les moûts fermentés des *Ethers*. Il n'y a rien d'étonnant à cela, puisqu'un éther est le résultat de l'action d'un alcool sur un acide et qu'on a un mélange riche en différents alcools et différents acides.

On trouve des *Aldéhydes*. Pour déceler leur présence, on emploie la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux. Si en présence de cette solution on met un aldéhyde, celui-ci s'empare de l'acide sulfureux et la coloration de la fuchsine réapparaît.

Les aldéhydes peuvent avoir deux origines :

1° Ils peuvent provenir de l'oxydation des alcools.

2° Ils peuvent également provenir de la dislocation des matières albuminoïdes de la cellule par suite de la nutrition de celle-ci.

L'*aldéhyde ordinaire* $CH^3 - CHO$ qui bout à 21° se trouve en assez grande abondance dans les produits de la fermentation.

Outre l'aldéhyde ordinaire on en trouve également d'autres qui correspondent aux alcools supérieurs.

Le *Furfurol* est un aldéhyde caractérisé par son action sur l'acétate d'aniline en liqueur acétique qui devient rouge. Il a pour formule de constitution

$$\begin{array}{ccc} CH & \text{—} & CH \\ | & & | \\ CH & & CHO \\ & \diagdown \; \diagup & \\ & O & \end{array}$$

Le furfurol a une double origine:

1° Il provient de la vie des cellules;

2° Quand on le trouve dans l'alcool de moûts amylacés ou de betteraves, il peut provenir du chauffage du moût à la distillation par suite de l'action des acides sur les pentosanes.

On trouve encore l'*Acétal*, combinaison d'alcool et d'aldéhyde,

$$CH^3CHO + \begin{array}{l} HO - C^2H^5 \\ HO - C^2H^5 \end{array} = H^2O + CH^3 - CH \begin{array}{l} \diagup O - C^2H^5 \\ \diagdown O - C^2H^5 \end{array}$$

liquide bouillant à 106°.

On trouve également de la *Mannite*, du *Terpène* ($C^{10}H^{16}$), un hydrate de ce corps et du *Camphre*. Peut-être ces deux derniers corps proviennent-ils des matières premières des moûts. Enfin on trouve :

Des *bases azotées volatiles* ayant les propriétés des

alcaloïdes végétaux. Une de ces bases est une méthyl-pyazine bouillant à 170°.

Variations dans les produits de la fermentation. — Tous ces corps n'existent pas toujours et sont en proportions qui dépendent d'une foule de circonstances.

1° **De l'état d'aération.** — Ce qui se comprend d'abord parce que chaque levure a ses besoins propres et ensuite parce que certains des produits précédents sont des produits d'oxydation directe d'autres produits.

2° **De la nature de la levure.** — On peut dire que chaque sorte de levure donne des produits différents ou en proportions différentes.

Exemple : culture dans 1 litre d'eau de touraillon.

Levure 1 Kayser : 95^{cc},9 d'alcool, 0,81 d'acide acétique, 4^{gr},74 de glycérine, 0,96 d'acide succinique.

Levure 37 Kayser : 87^{cc},6 d'alcool, 0,70 d'acide acétique, 2^{gr},81 de glycérine, 0,82 d'acide succinique.

3° **De l'acidité.** — Par exemple :

La levure 2 Kayser donne	glycérine	: 1^{gr},44	en moût	neutre
	—	: 1^{gr},73	—	acide.

4° **De la température.** — Exemple :

Levure de vin n° 2 Kayser cultivée dans de l'eau de touraillon à 181 grammes de sucre par litre.

à 25° : sucre restant 2,70, acides volatils 0,98, glycérine 3,40, poids de levure formée 0,566.

à 35° : sucre restant 1,15, acides volatils 0,78, glycérine 1,243, poids de levure formée 1^{gr},492. Le tout en grammes.

En général, il y a par augmentation de la température diminution de la glycérine et augmentation de l'acidité totale.

5° **De la nature du moût.** — Et par conséquent :

α) De la nature du sucre.

β) De la concentration.

γ) Des matières azotées.
δ) De la nature des acides.
ε) De l'acidité.
ζ) De la durée.
η) Des antiseptiques.

α) **Influence de la nature du sucre.** — L'exemple suivant emprunté à Pasteur montre bien l'influence de la nature du sucre.

Culture dans l'eau sucrée + eau de levure.

		ac. succinique	glycérine	rapport
Lactose. . . .	9gr,95	0,075	0,338	4,5
Glucose. . . .	9gr,81	0,066	0,297	4,4
Inverti. . . .	9gr,98	0,058	0,280	4,7
Saccharose. . .	9gr,90	0,068	0,288	4,2

β) **Influence de la concentration.** — L'influence de la concentration est très marquée.

Quand il s'agit de saccharose la limite de 30 pour 100 est une limite extrême. Ordinairement les teneurs de 10-20 pour 100 sont les meilleures pour le sucre, pour la glucose, la lévulose, la maltose.

En général, un excès de sucre produit un excès d'acides volatils.

Certains auteurs admettent 2 optima pour la concentration ; ainsi au point de vue de la fermentation proprement dite, Wiesner admet de 2 à 4 pour 100 et de 20 à 25 pour 100 de saccharose.

Au point de vue de la multiplication dans les moûts amylacés, Archleben admet de 10 à 14 pour 100 et de 19 à 25 pour 100 de maltose.

γ) **Influence des matières azotées.** — Quand elles sont en quantité suffisante l'acide succinique et la glycérine sont moindres.

δ) **Influence de la nature des acides.** — Elle agit surtout sur la glycérine et les acides volatils.

Voici deux exemples indiqués par M. Lafar, relatifs à 2 levures de vin et à du moût de raisin.

	GLYCÉRINE PAR LITRE	
	I	II
Moût naturel	6,96	6,98
Neutralisé	7,30	8,72
Additionné d'acide succinique	6,98	8,32
— acétique	5,66	6,06
— oxalique	7,34	6,92
— malique	7,72	7,56
— tartrique	6,98	7,44

On voit que, dans les 2 exemples, l'acide acétique tend à diminuer la glycérine. Les acides succinique et oxalique produisent pour les 2 cas, l'un, un relèvement, et l'autre, un abaissement. Les acides tartrique et malique produisent le relèvement de la glycérine.

Voici, au point de vue de l'acidité volatile, des chiffres indiqués par Kayser.

Levure 71.

3gr,75 d'acide tartrique par litre 0gr,57 d'acide acétique produit
3gr,50 d'acide citrique par litre 0gr,30 —

ε) **Influence de la dose d'acidité.** — Par exemple, la levure 14 de Kayser avec une

acidité initiale de 4gr d'acide tartrique donne 0gr,25 d'acide acétique.
— 8gr — — 0gr,58 —

ζ) **Influence de la durée.** — Elle intervient naturellement au point de vue de la quantité des produits, mais elle agit aussi sur leurs proportions relatives parce que tous les produits ne se forment pas parallèlement.

η) **Influence des antiseptiques.** — On l'étudiera à part.

Vitesse de la fermentation alcoolique.

En 1874, Dumas a indiqué que la durée de la fermentation est proportionnelle à la quantité de sucre présente. Ce fait a été vérifié dernièrement par O. Sullivan, relativement à la glucose et à la maltose. Celle-ci fermente moins vite et d'ailleurs la vitesse de fermentation de ces sucres est différente de la vitesse d'inversion de la saccharose.

En 1892, Brown a montré que la concentration n'intervient guère pour des concentrations de 10 à 20 pour 100. En effet il a prouvé qu'alors le même poids de sucre disparaît par le même nombre de cellules.

Il est bien évident que la vitesse dépend du nombre des cellules; tant que celui-ci ne dépasse pas une limite déterminée, il y a presque proportionnalité. Mais lorsque le nombre des cellules devient trop grand, elles se gênent mutuellement, de sorte qu'à partir d'une certaine limite le nombre des cellules n'influence plus la vitesse de fermentation.

Quel que soit d'ailleurs le nombre des cellules, l'agitation accélère la fermentation (nous avons vu qu'elle gêne la multiplication). La matière alimentaire du moût intervient dans la vitesse, et si le nombre des cellules primitives n'est pas exagéré, une bonne alimentation accélère la multiplication et la vitesse de fermentation.

Cela résulte d'expériences d'Hayduck, de Stern, d'O. Sullivan.

Par exemple :

dans 10gr de maltose et 100gr d'eau, 6gr de levure détruisent en 4 h. 2gr,21
dans — 50gr d'eau plus 50gr d'eau de levure, 6gr de levure détruisent en 4 h. 3gr,26.

Pouvoir ferment des levures.

D'une manière générale, on appelle pouvoir ferment d'un microbe le rapport de la quantité de matière détruite au poids du microbe produit.

En ce qui concerne la levure, ce sera le rapport du poids de sucre détruit au poids de levure formé.

Pasteur considérait ce rapport comme un *indice* des bonnes fermentations sans le prendre pour *criterium* de la puissance de fabrication d'alcool.

Pasteur considéra le rapport précédent comme diminuant par l'aération à la suite des expériences suivantes : dans un vase à fond plat, contenant une quantité de sucre déterminée, il met une trace de levure, et arrête la fermentation au bout de 30 minutes. Le rapport est alors égal à 4.

Une opération du même genre dans un vase non aéré donne après 90 jours un rapport de 175.

Mais un certain nombre d'auteurs ont trouvé un résultat contraire.

Ce n'est pas étonnant, car l'expérience dépend d'un grand nombre de facteurs : de la nature et de la richesse en sucre ; du temps ; de l'immobilité du liquide (l'agitation augmente le rapport) ; du mode de culture (des cultures répétées sur gélatine donnant un rapport plus grand) ; des matières alimentaires (ainsi dans une culture en peptone, si le rapport sucre à peptone augmente le pouvoir ferment augmente).

Enfin la présence des antiseptiques à petite dose l'augmente tandis qu'ils le diminuent à forte dose.

Théorie de M. Duclaux. — M. Duclaux a serré la question de plus près. Dans une culture on introduit λ de levure, au bout du temps T, on a L.

Supposons que dans un temps dT, la levure augmente de dL en employant mdL de sucre à sa construction.

Soit a la quantité de sucre consommé dans le temps 1 par 1 de levure en dehors de dépense de construction.

Soit dS le sucre disparu.

On a évidemment $dS = mdL + aLdT$.

A supposer que pendant toute la fermentation m et a soient constants, on peut intégrer si l'on connaît la relation entre L et T.

Admettons la loi de Hansen $L = \lambda(1 + bT^2)$ (accroissement proportionnel au carré des températures).

$$dL = 2b\lambda T dT,$$
$$dS = dT(2mb\lambda T + a\lambda[1 + bT^2]),$$
$$S = mb\lambda T^2 + a\lambda T + \frac{ab\lambda}{3} T^3 + \text{constante}.$$

Si $T = 0$, $S = 0$, donc

$$S = a\lambda T + b\lambda T^2 \left(m + \frac{aT}{3}\right),$$
$$S = a\lambda T + (L - \lambda)\left(m + \frac{aT}{3}\right).$$

En négligeant λ,

$$S = L\left(m + \frac{aT}{3}\right),$$
$$\frac{S}{L} = m + \frac{aT}{3}.$$

Le pouvoir ferment croît donc proportionnellement au temps.

On comprend pourquoi ce rapport ne représente pas le criterium de la quantité d'alcool produit, il dépend de m qui peut être plus ou moins grand, quelle que soit la dose d'alcool produit, il dépend de a, qui est fonction non seulement de la dose d'alcool produit mais aussi du sucre brûlé dans la respiration.

M. Duclaux pense que m est voisin de 2, voici

pourquoi : si la levure avait la composition hydrocarbonée du sucre, comme elle est azotée pour faire 1 de levure, il faudrait un peu moins de 1 de sucre ; mais la levure est plus carbonée que le sucre de plus d'un quart, de sorte qu'il faut plus de 1 de sucre pour faire 1 de levure.

Donc $m > 1$.

D'autre part, l'expérience indique qu'en 24 heures avec 4 grammes de sucre on fait 1 de levure. Mais pendant ce temps la dépense d'entretien s'effectue, donc $m < 4$. C'est pourquoi M. Duclaux prend m égal à 2 pour une période de 1 jour.

D'où $$4^{gr} = 2 + \frac{a}{3}, \qquad a = 6.$$

Une expérience de Pasteur conduit à la même valeur $a = 6$.

Dans une expérience de 100 jours, 100 grammes de sucre ont disparu en faisant $0^{gr},5$ de levure.

Donc $$100 = 2 \times 0,5 + \frac{a}{3} \times 100 \times 0,5$$

$$100 = 1 + \frac{a}{3} \times 50$$

$$a = \frac{3 \times 99}{50} = \text{sensiblement } 6.$$

Principales espèces de levures en distillerie.

Caractères distinctifs. — Quelquefois les races se sont trouvées isolées par sélection naturelle, mais en général les différentes races de levure ont été isolées par une des méthodes de culture indiquées plus haut. Une fois isolées, on a essayé de les caractériser. Les nombreux caractères sont essentiellement variables et une caractérisation n'a d'importance que si on fait intervenir tous les caractères à la fois.

1° **Forme de la levure.** — Ordinairement la forme des cellules est plus ou moins elliptique, mais elles peuvent avoir des formes différentes.

La levure Ludwigii a la forme d'une bouteille.

La levure Pombe a la forme d'une massue.

Ce caractère de la forme est un des plus variables. Il dépend de l'âge de la cellule (les vieilles étant ratatinées) ; la température tend, lorsqu'elle augmente, à rendre les cellules rameuses. De même, lorsque l'acidité du moût croît, les levures ont une tendance à se ramifier. Une richesse saccharine trop grande produit encore le même effet.

L'aération fait varier également la forme (voile).

2° **Nature du bourgeonnement.** — Nous avons vu que, dans la plupart des levures, le bourgeon se forme par étranglement, mais nous avons également vu que certaines races bourgeonnent par une sorte de cloisonnement (S. Ludwigii, etc.).

Souvent les bourgeons s'isolent ; d'autres fois ils restent accolés aux cellules mères et forment des paquets ou des chapelets (1).

3° **Réseau gélatineux.** — Nous avons déjà parlé de ce réseau, résidu du mycélium, que l'on trouve, par exemple, dans les cultures sur gélatine du Sac. Marxianus.

Il est probable que la présence de ce réseau contribue à produire l'aspect caséeux de certaines levures.

4° **Nature du dépôt.** — En tout cas, la nature du dépôt des levures dans les différents milieux est un caractère distinctif.

5° **Aspect des cultures sur gélatine.** — D'une façon générale, les cellules sont plus allongées. Certaines espèces

---

(1) On pourrait peut-être aussi faire intervenir la durée de la génération. Ainsi Hoyer a montré qu'à 13° les durées de reproduction pour une levure elliptique I a été de 9h4, pour une levure Saccz de 7h48 pour une adiculatus 4h45. Mais à 25° les durées sont différentes et plus courtes.

liquéfient la gélatine ; d'autres, au contraire, ne la liquéfient pas. Elles peuvent présenter l'aspect de colonies en surface ou en profondeur, etc., toutes ces apparences peuvent être distinctives (1).

6° **Spores.** — Les spores peuvent servir de plusieurs manières à caractériser les levures.

α) **Forme de la spore.** — La forme de la spore est très variable. Elle n'est caractéristique qu'à la condition d'opérer dans des milieux connus, à température déterminée et de ne faire sporuler la race étudiée qu'après un nombre également déterminé de rajeunissements.

Si l'on examine une vieille cellule, les spores n'apparaissent pas. Il faut au moins quatre, quelquefois jusqu'à dix cultures successives pour obtenir un descendant sur lequel on puisse voir la sporulation se produire.

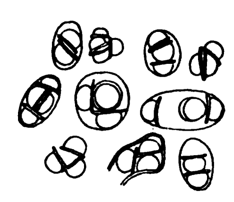


Fig. 42. — Saccharomyces Anomalus (spores). D'après Jorgensen et Kayser.

La forme de la spore dépend du nombre de rajeunissements. Par exemple la spore de la 10e génération peut ne pas avoir la même forme que celle de la 4e.

Comme exemple de formes caractéristiques, nous rappellerons celle du S. Anomalus (fig. 42).

β) **Faculté de sporuler.** — Nous savons que toutes les cellules ne peuvent pas sporuler. Cela dépend de l'âge, du nombre de rajeunissements, de la température.

Nous savons que la faculté de sporuler disparaît avec l'âge ou à la suite d'une série de cultures dans certains milieux. Nous savons de plus qu'elle peut ensuite réapparaître.

---

(1) M. Holm a constaté que sur gélatine 40 pour 100 des cellules jeunes ne se développent pas tandis qu'il n'y a que 25 pour 100 des cellules vieilles qui restent inertes.

D'où la conséquence d'ensemencer la gélatine avec des cellules âgées.

En tenant compte de ces faits, la faculté de sporuler peut être caractéristique des races.

γ) **Époque de l'apparition des spores.** — Nous savons que le départ de la sporulation dépend du nombre de rajeunissements, du milieu de culture, de la température.

Nous savons qu'il peut se faire que 2 races sporulent à la même température avec la même rapidité et qu'à une autre température il y ait des différences sensibles. Il sera donc bon d'observer à deux températures distinctes les espèces à déterminer.

δ) **Mode d'éclosion.** — La spore peut encore servir à caractériser les levures par le mode de germination. Sous ce rapport il y a deux groupes de levure distincts : dans le premier groupe la levure qui contient les spores s'entr'ouvre ; celles-ci saillissent et se mettent à leur tour à bourgeonner. Dans le cas de S. Ellipsoideus, il y a fusion de 2 spores avant l'éclosion. Dans le second groupe, toutes les spores qui sont à l'intérieur de la cellule se fusionnent en une seule, et le tube formé fait saillie à l'extérieur et se cloisonne.

ε) **Mode de germination.** — La spore peut encore servir à caractériser les levures par son mode de germination.

Nous avons vu en effet que sous ce rapport le S. Ludwigii et le S. Anomalus se distinguent nettement des autres.

On peut encore utiliser pour distinguer les races :

7° **Pouvoir réducteur.** — Le pouvoir réducteur des levures, qu'on évalue par l'action sur le sulfate de magnésie en présence du sous-nitrate de bismuth comme indicateur.

D'après Nastucoff, il peut y avoir des différences notables.

Une levure de champagne ayant donné l'effet 1, la levure apiculée a donné 0,35.

8° **Sucres attaqués.** — Les sucres fermentant par une

levure, dans des conditions bien déterminées, sont à utiliser pour caractériser les levures.

9° **Produits de la fermentation.** — Les produits de la fermentation, qu'une levure fournit dans les conditions déterminées de milieu de culture et de température, sont une excellente indication de la race de la levure considérée. En particulier, on considère souvent :

α) **La glycérine obtenue.** — Elle dépend de la race, mais dépend aussi de l'acidité, de la température et de la présence d'antiseptiques.

β) **Le sucre restant.** — Cette quantité dépend non seulement de la levure, mais de la température, de l'acidité et de la nature de l'acide.

γ) **L'atténuation obtenue.** — Elle dépend du moût et de la température.

Rappelons qu'en mélange de levures l'atténuation obtenue n'est pas la moyenne des atténuations spéciales à chaque levure.

10° **Qualité du produit obtenu.** — La clarté de la bière, la limpidité du vin, etc., qualités dues aux levures, sont des caractères utiles pour l'identification des cellules.

Remarque importante. — Les caractères qui ont été indiqués pour identifier les races de levures sont variables, de sorte qu'il est indispensable de les employer tous à la fois et dans des conditions parfaitement déterminées pour en tirer parti. Cela est d'autant plus nécessaire que certains d'entre eux peuvent, après variation, se fixer soit d'une manière temporaire, soit d'une manière définitive; ce qui peut naturellement conduire à des erreurs sur la véritable race d'une levure.

Variations non définitives. — Parmi les variations pouvant se fixer temporairement pendant quelques générations, on peut citer l'effet dû à la non-aération.

Un autre caractère pouvant induire en erreur est l'atténuation. Il peut se faire qu'en remettant une levure dont

l'atténuation a varié sous des influences déterminées, dans les conditions primitives, l'atténuation ne revienne à ce qu'elle était au début qu'après plusieurs générations.

Un autre caractère est la clarté des moûts. Très souvent une cellule après avoir donné un moût clair en donne ensuite un trouble si les circonstances ont varié. Or il peut se faire qu'il faille plusieurs générations pour que le moût redevienne clair après que la levure aura été replacée dans les conditions primitives.

Prenons dans une même culture une cellule du fond et une du voile. Cultivons ces deux cellules dans deux milieux identiques et à l'abri de l'air. Les descendants de la levure provenant du fond ne sont pas semblables à ceux provenant du voile et ne redeviennent semblables qu'après 5 ou 6 générations.

Variations définitives. — Un certain nombre de variations peuvent devenir définitives et l'on peut créer, à proprement parler, des races de levure.

Examinons les variations qui peuvent devenir stables.

Dans certaines circonstances une levure peut perdre la faculté de sporuler et de donner des voiles. Or, les caractères tirés des spores quant à la forme, à la température, à l'époque de l'apparition, etc., comptent parmi les plus importants.

Le voile est également un caractère de premier ordre. Si on cultive une levure à une température supérieure à celle où les spores prennent naissance, mais inférieure à celle où la levure bourgeonne, elle perd la propriété de donner des spores et des voiles et la propriété contraire est en général acquise pour la descendance, du moins si les conditions de milieux restent les mêmes.

Cette inaptitude à la sporulation peut être obtenue pour toutes les races de levures, à l'exception de quelques-unes qui font exception ; le saccharomyces mem-

branæ faciens est la seule race parmi les races cultivées qui fasse exception.

Il y a une autre sorte de levures qui ne perd pas la faculté de sporuler. Ce sont les levures sauvages, celles qui par exemple s'introduisent en brasserie et sont la cause d'un mauvais travail. Elles sont très prolifiques et sporulent très facilement. Ces levures ne perdent pas, même en se plaçant dans les conditions indiquées plus haut, la propriété de faire des spores. On peut considérer ce caractère comme un des meilleurs caractères spécifiques des levures sauvages.

Différentes espèces de levures. — Nous allons les classer d'après leurs origines :

1° **Levures de brasserie.** — La fig. 43 représente un S. Cerevisiæ; la fig. 44 sa sporulation ; les fig. 45 et 46 la germination des spores, la fig. 47 le voile et la fig. 48 un voile âgé.

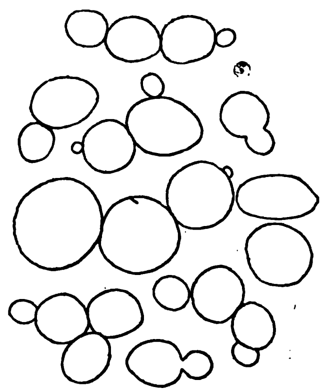


Fig. 43. — Saccharomyces Cerevisiæ. D'après Jorgensen.

La levure de brasserie proprement dite a été la première étudiée. Pasteur y a distingué deux races en faisant des cultures dans du moût de bière acidulé d'acide tartrique, afin d'éliminer les bactéries. A ces deux levures particulières, il a donné le nom de *levure haute* et de *levure basse*.

Une levure haute est une levure qui nage à la surface des moûts. Les cellules restent en paquets et forment des sortes de radeaux soulevés par le gaz carbonique. La fig. 49 représente la germination des spores de la levure haute.

Une levure basse s'isole et les cellules trop petites n'offrent pas une surface suffisante pour être soulevées

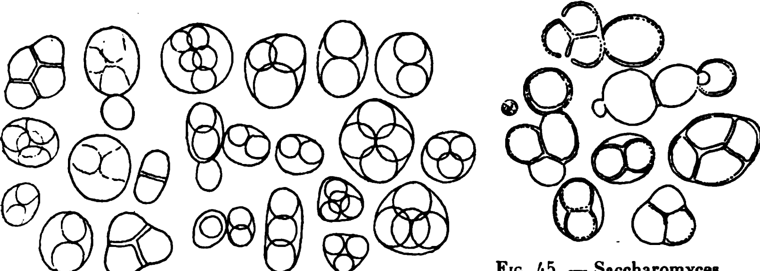


Fig. 44. — Saccharomyces. Spores. D'après Jorgensen.

Fig. 45. — Saccharomyces. Début du bourgeonnement des spores. D'après Jorgensen.

par le gaz ; elles sont entraînées par leur poids et tombent au fond des moûts. En ce qui concerne la température, en général, la levure haute fermente à haute tempé-

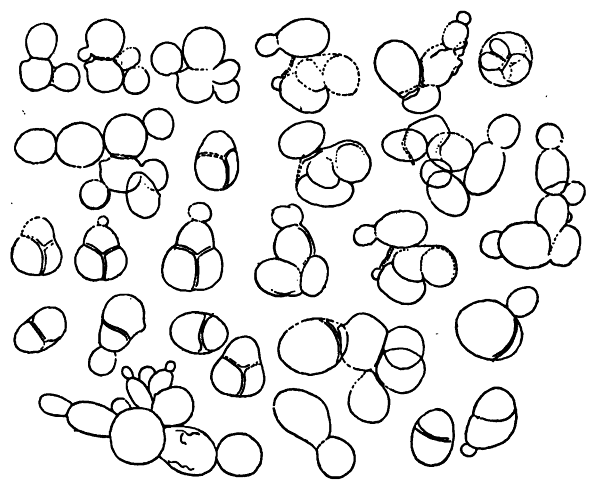


Fig. 46, — Saccharomyces. Bourgeonnement des spores. D'après Jorgensen et Lindner.

rature et la levure basse à température basse, ce qui fait que souvent l'expression levure haute ou levure basse est comprise comme ayant rapport à la température.

Les levures basses font fermenter la raffinose et la mélibiose.

Les levures hautes hydrolysent la raffinose et laissent intacte la mélibiose.

Hansen a repris les études de Pasteur et a constaté que la levure basse était dédoublable en deux races qu'il a dénommées Carlsberg I et II, du nom de son laboratoire (fig. 50).

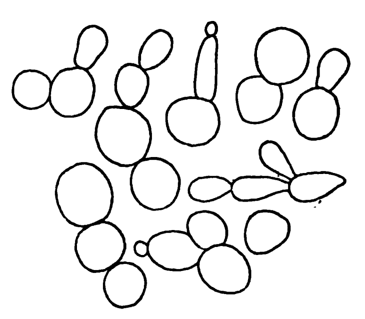


Fig. 47. — **Saccharomyces. Voile. D'après Jorgensen et Lindner.**

On a généralisé la méthode de Hansen et on a trouvé que les différentes bières devaient leur saveur spéciale à un grand nombre de levures différentes.

Par exemple :

La levure Saaz est une levure basse à faible atténuation (1). Son nom est celui d'une localité hongroise.

La levure Frohberg est une levure basse à atténuation plus forte. Son nom est celui d'une brasserie de Grimma, également en Hongrie.

La levure Burton est à plus forte atténuation.

La levure Logos est à très grande atténuation.

2° **Levures pour distillerie de grains.** — Les levures de brasserie utilisées en distillerie sont en général des levures hautes à cellules rondes ou ovales et grosses (de 8 à 12 μ) ; leurs spores sont moitié moins grosses.

En appliquant aux moûts amylacés de distillerie les règles de sélection appliquées aux moûts de brasserie, on obtient une sélection des races de levure de bière acclimatée au moût de distillerie.

---

(1) D'ailleurs une levure de brasserie ne doit pas agir sur les dextrines.

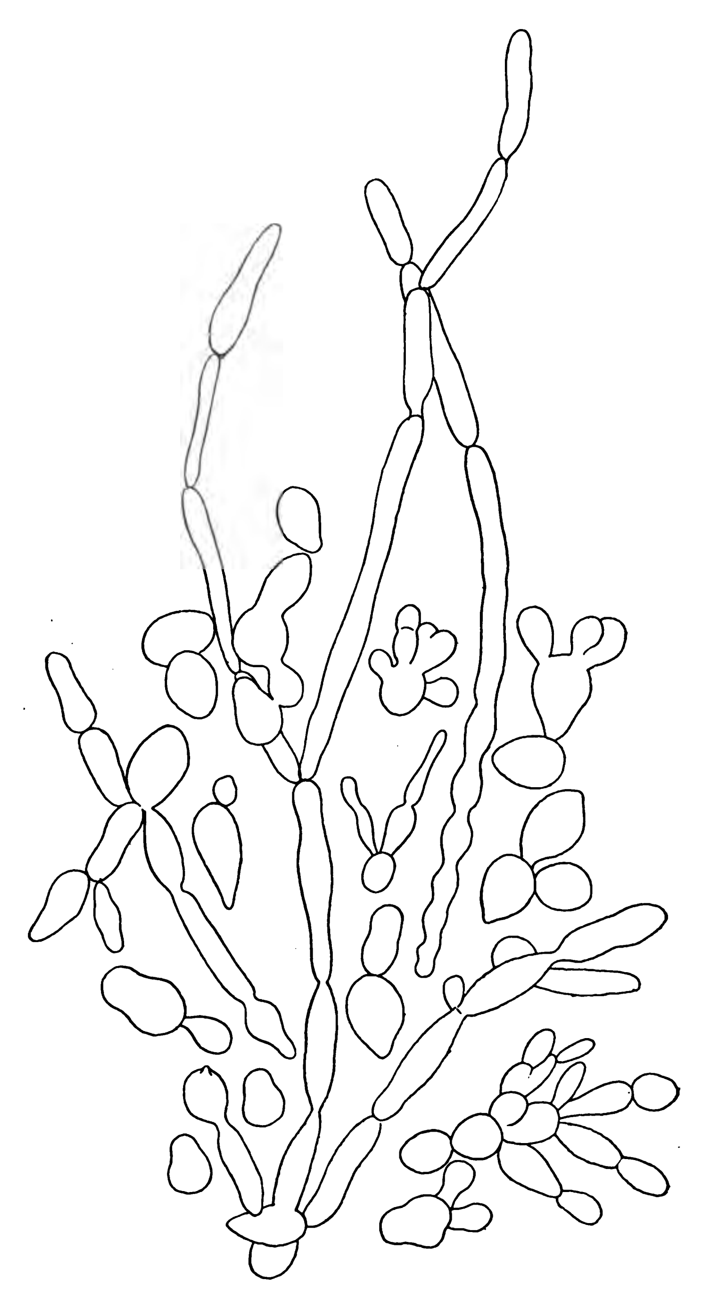


FIG. 48. — Saccharomyces. Vieux voile.
D'après Jorgensen et Lindner.

On a ainsi créé un certain nombre de races auxquelles on a donné un n° d'ordre. Par exemple :

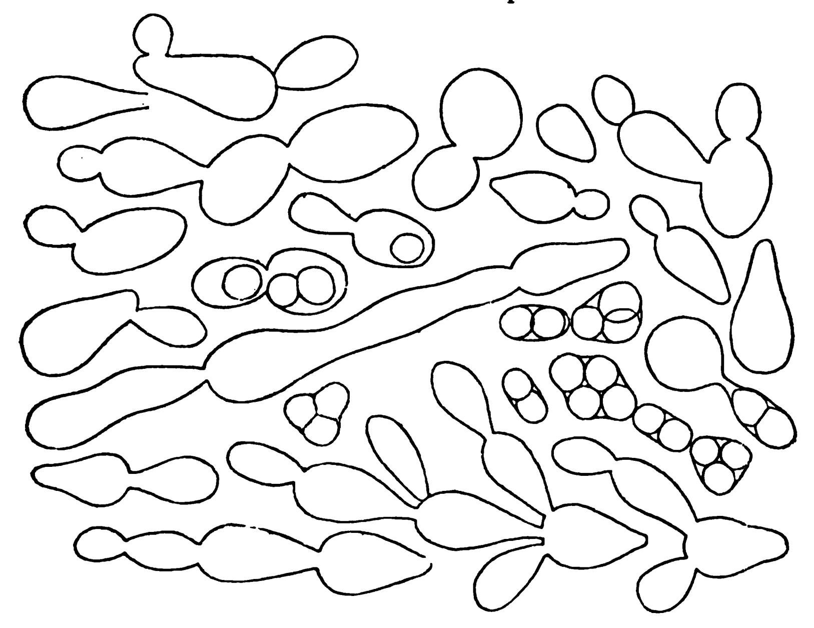


Fig. 49. — Spores de levure haute.
D'après Lindner.

La race I produit une fermentation primaire languissante et une fermentation secondaire peu active.

La race II produit une fermentation primaire plus active et une fermentation secondaire très énergique. C'est ce qui a fait son succès.

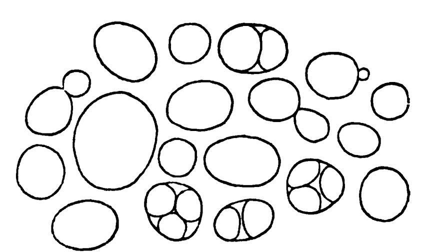


Fig. 50. — Levure basse Carlsberg.
D'après Jorgensen.

La race III est moins bonne que la précédente.

La race IV est encore moins bonne et est très lente.

Le caractère de ces levures est de faire fermenter la maltose, mais elles attaquent également la saccharose, la glucose, la lévulose.

Quelques levures se rattachent aux levures de brasserie en ce sens qu'on en trouve dans la bière.

3° **Sacch. Exiguus.** — Le Sacch. Exiguus se présente sous forme de cellules petites en forme de sabots ou de quilles de 2,5/5 μ. Il forme des voiles et une sorte de couronne; il a 2 à 3 spores par cellules en file longitudinale. On le trouve dans les bières où il passe pour un ferment secondaire ; il ne cause aucune perturbation dans la bière; il fait fermenter peu activement le moût de bière, mais il fait surtout fermenter la saccharose et la glucose.

4° **Sacch. Anomalus.** — Le sacch. anomalus est constitué par de petites cellules ovales ou boudinées. Il donne un voile gris mat où l'on trouve les spores en chapeau déjà décrites (fig. 51).

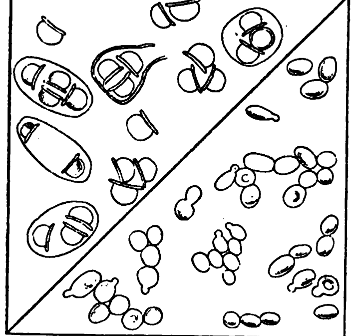


Fig. 51. — Saccharomyces anomalus. D'après Kayser.

Souvent il donne naissance à une odeur de fruits.

Il se trouve dans les brasseries et sur les raisins pourris (1).

5° **Sacch. Minor.** — On peut rapprocher des levures de brasserie la levure sacch. minor qui existe dans le levain de boulanger. Elle est formée de tout petits globules.

(1) M. Steuber vient de décrire 4 variétés d'anomalus ; la 1re a son optimum entre 25° et 30°, elle sporule à 25° en 13 heures et meurt à 60° ; la 2e a son optimum à 30°, elle est tuée à 65°, sur gélatine elle donne des colonies roses. La 1re variété fait fermenter la saccharose, la dextrose et la lévulose qui reste indemne par la 2e variété. Les 2 autres variétés ne font fermenter aucun sucre ; la dernière donne sur gélatine des colonies jaunes.

6° **Sacch. Marxianus.** — Cette levure se trouve dans la bière quoique incapable de faire fermenter la maltose. Elle est représentée par de petites cellules ovales; les vieilles ayant un rudiment de mycélium ; sur gélatine les cellules deviennent longues et boudineuses (fig. 52).

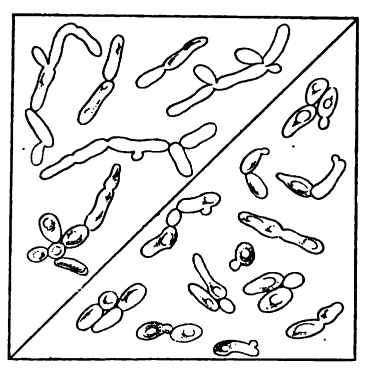


Fig. 52. — Saccharomyces Marxianus. D'après Kayser.

Elle fait fermenter la glucose et la saccharose.

7° **Levures de vin.** — Dans la fermentation du raisin en vue de la fabrication du vin, il existe un grand nombre de levures qui ont été sélectionnées par

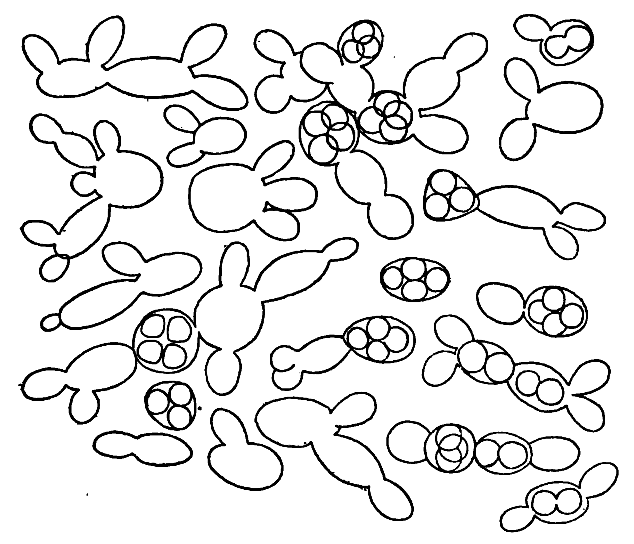
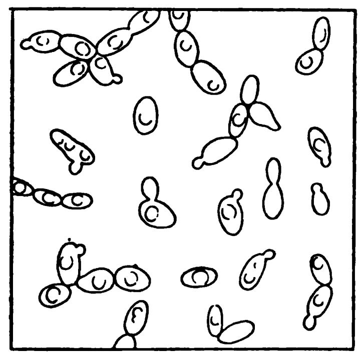


Fig. 53. — Spores de Saccharomyces Ellipsoïdeus. D'après Jorgensen.

les méthodes générales et caractérisées surtout à l'aide

des produits de la fermentation. Ce sont des levures elliptiques, rondes, en bouteilles, etc., qui résistent particulièrement à la chaleur et à l'acidité, qui sont très



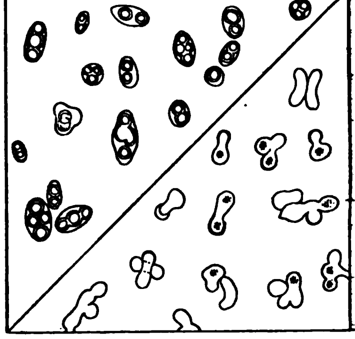
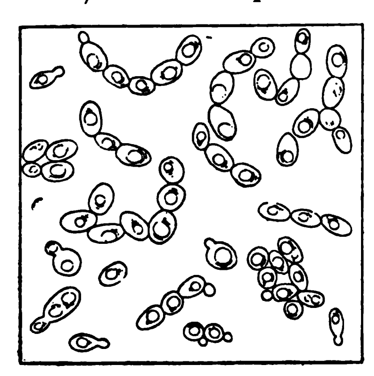


Fig. 54. — Levure de vin. Fig. 55. — Levure de vin. Spores avant et après la germination.
D'après Kayser.

actives, donnent beaucoup d'alcool, des acides volatils, des produits aromatiques et des vins plus ou moins limpides.

Nous citerons :

α) **Sacch. Ellipsoïdeus.** — (Subdivisé en plusieurs



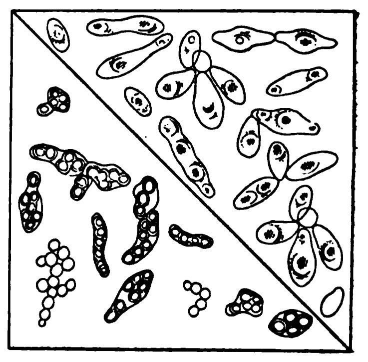


Fig. 56. — Levure de vin. Fig. 57. — Levure de vin.
D'après Kayser.

races). Nommé ainsi à cause de sa forme, il constitue une

levure basse (1). Les fig. 37 et 38 représentent un S. Ellipsoïdeus et son voile, la fig. 53 représente les spores du même.

La fig. 54 représente une levure de vin et la fig. 55 les spores inertes et germant de la précédente. Les fig. 56, 57 et 58 représentent d'autres levures de vins et de leurs spores.

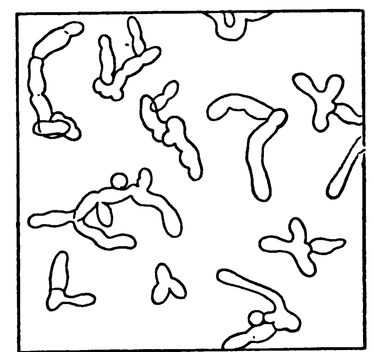


Fig. 58. — Levure de vin. Spores en germination. D'après Kayser.

L'Ellipsoïdeus fait fermenter la saccharose, la glucose et la maltose.

Il cause un trouble de la bière ; certaines variétés donnent un goût amer.

β) **Sacch. Pastorianus.** — (Subdivisé en plusieurs races). Il est formé de cellules (fig. 59) ovales piriformes de 12-24 μ, quelquefois en chaînes ramassées formées d'articles en massue, donnant facilement spores et voiles (fig. 60). Il fonctionne comme levure haute.

Il fait fermenter la saccharose et la maltose ; il trouble la bière.

8° **Levures pour distillerie de mélasses ou de betteraves.** — En général, dans la pratique courante on emploie des levures de bière ordinaire, où se développe de la sucrase.

De même qu'on sélectionne les levures de bière pour le service de la distillerie de grains, on a sélectionné les

---

(1) D'après Ivan Schukow qui a essayé l'action des levures de vin sur la raffinose, elles se comportent comme levures hautes.

Mises sur bière, elles sont à faible atténuation, sauf une qui est du type Frohberg.

levures propres à la fermentation de la saccharose (betteraves et mélasses). On a cherché la source de ces levures soit dans la fermentation de mélasse de canne, soit dans celle de vins alcooliques, tels que les vins d'Espagne. La raison d'être de ce mode opératoire est qu'on désire travailler à haute température pour aller vite et qu'on doit s'adresser à des levures riches en sucrase ou contenant une sucrase résistante.

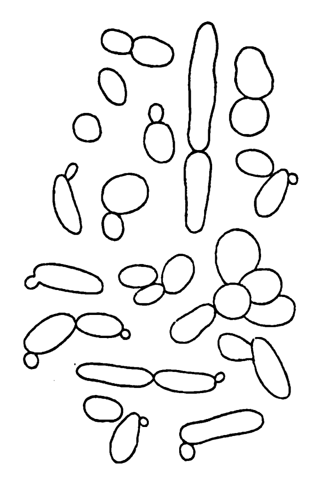


Fig. 59. — Saccharomyces Pastorianus. D'après Jorgensen.

Ordinairement, en ce qui concerne la mélasse, que l'on emploie de la levure ordinaire ou une levure sélectionnée, on la place d'abord dans un pied de cuve fait de grains.

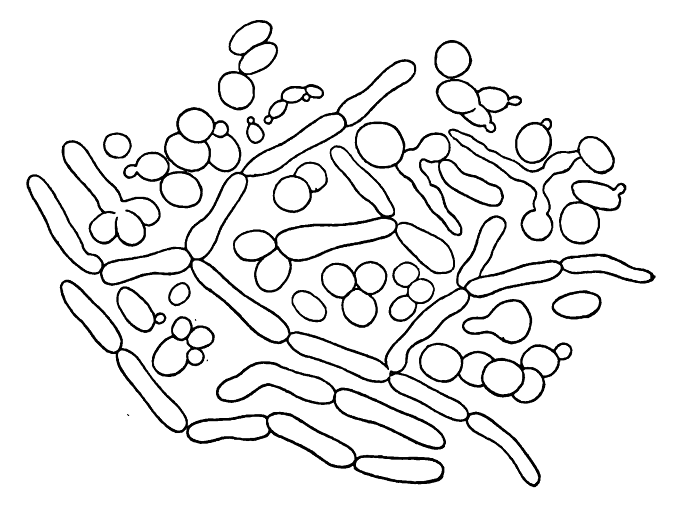


Fig. 60. — Saccharomyces Pastorianus. Voile. D'après Jorgensen.

D'après Effront, cette manière de faire est inutile (1); il pense qu'on peut obtenir des levures à sucrase suffisamment active et résistante pour travailler les mélasses pures.

Pour les obtenir on les acclimate aux moûts de mélasse normaux en passant par des moûts graduellement concentrés.

Effront a remarqué que cette acclimatation n'est pas acquise comme celle qui correspond aux antiseptiques.

Dans le travail de l'arrak, on a trouvé à côté de moisissures spéciales un Saccharomyces, le S. Vordermannii, qui fait fermenter 18 pour 100 du sucre en 3 jours à 30° et qui résiste à 10 vol. d'alcool.

9° **Levures de cidre.** — Dans le cidre on trouve un certain nombre de levures faisant fermenter le jus de pommes.

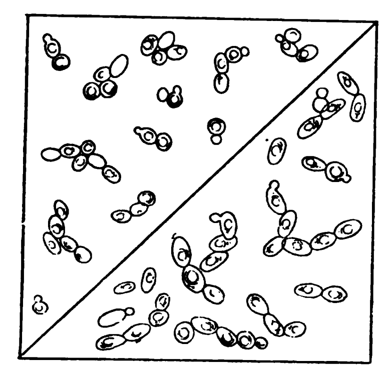


Fig. 61. — Levure de cidre ; en haut levure Resler ; en bas levure Duclaux. D'après Kayser.

α) **Sacch. Mali Duclauxi.** — Cellules elliptiques de 6/10 μ formant un dépôt flottant qui donnent un voile sensible à l'acidité et meurent à 55° ; elles sporulent à 15° en 20 heures (fig. 61, partie inférieure).

Elles n'agissent que sur la glucose ou l'inverti ; elles n'agissent pas sur la saccharose et la maltose.

(1) Quand on met une levure habituée à un moût de grains dans de la mélasse, le peu d'action de cette levure n'est pas dû, comme on pourrait le croire, à un effet retardateur des sels de la mélasse, il est dû simplement au changement brusque de nutrition.

β) **Sacch. Mali Risleri.** — Cellules sphériques de 4 à 6 μ tuées à 60° formant un dépôt adhérent aux parois et dont les spores se forment à 15° en 90 heures.

Elles font fermenter la saccharose, la maltose et la glucose (fig. 61, partie supérieure).

10° **Saccharomyces d'origines diverses.** — α) **Saccharomyces membranæ-faciens.** — Se trouve dans le mucilage du bois d'orme. Il existe dans les eaux de puits, dans le cassis. Les cellules sont ovales, allongées, à vacuoles nombreuses, elles forment facilement des voiles plissés sur les moûts de bière. Elles donnent des colonies plissées sur gélatine qu'elles liquéfient. Elles invertissent et font fermenter la saccharose, la maltose ; elles agissent sur la glucose (fig. 62).

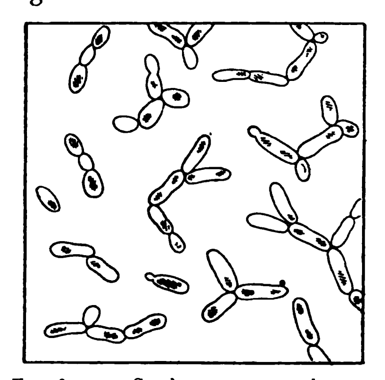


Fig. 62. — Saccharomyces membranæ-faciens. D'après Kayser et Lindner.

β) **Saccharomyces Rouxii.** — Se présente sous la forme de petits grains ronds souvent en paquets ; il fait fermenter la glucose et la lévulose, mais n'agit pas sur la saccharose. On peut l'employer pour faire l'analyse d'un mélange de glucose et de saccharose.

γ) **Saccharomyces Ludwigii.** — Cette levure se trouve dans le mucilage du bois de chêne. On doit citer à part ce saccharomyces à cause de son mode de bourgeonnement. La cellule est en forme de bouteille et le bourgeon est accolé à la cellule mère par une petite surface qui tend à se réduire à un point. Nous avons indiqué le mécanisme de l'opération (fig. 63 et 64).

Quand les spores doivent sortir de la cellule mère, au lieu de se présenter contre la paroi et de saillir au dehors,

ces spores se fusionnent à nouveau en formant un tube

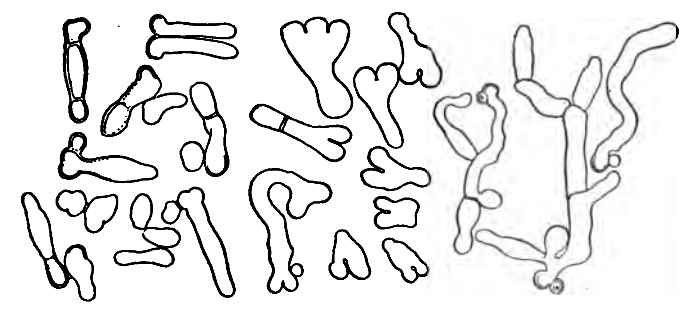


FIG. 63. — Saccharomyces Ludwigii.
D'après Lindner.

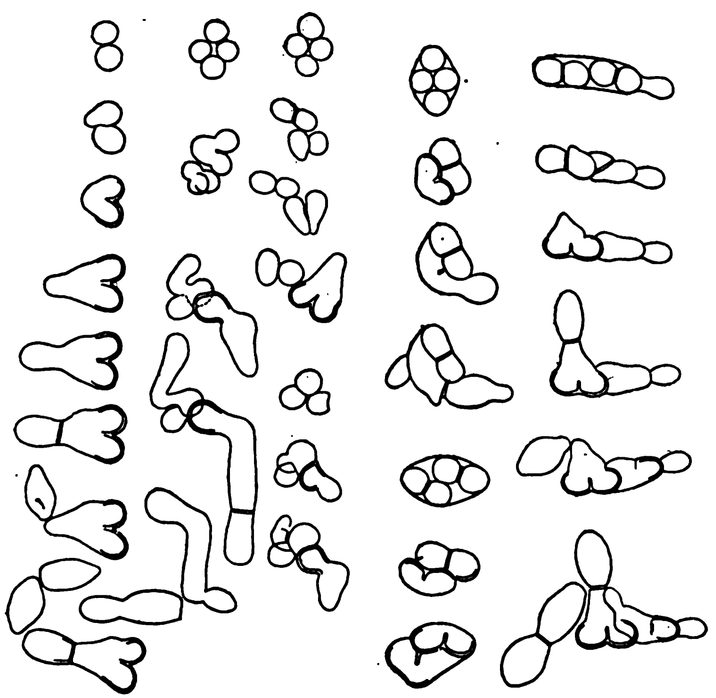


FIG. 64. — Saccharomyces Ludwigii. Spores en germination.
D'après Lindner et Jorgensen.

qui se présente alors contre la paroi, saillit au dehors

en se cloisonnant en cellules qui sont autant de spores.

Cette levure fait fermenter la saccharose, la glucose, mais n'agit pas sur la maltose.

11° **Levures dites Schizosaccharomyces.** — Dans ces levures la cellule ne fait pas à proprement parler de bourgeons. Elle se cloisonne en formant des cloisons internes de l'extérieur vers l'intérieur. C'est une véritable scissiparité d'où le nom de Schizosaccharomyces. Au point de vue du mode de formation c'est le même mécanisme que pour le Ludwigii mais les traces du cloisonnement de celui-ci tendent à disparaître rapidement.

Dans ce groupe nous ne trouvons que quelques levures nous intéressant.

α) **Levure Pombe.** — Elle a été rapportée d'Afrique. On la trouve dans la bière de Sorgho. Elle a une forme allongée. Elle fait fermenter la glucose, la maltose et l'une des achroodextrines directement sans transformation préalable en maltose, elle résiste à une forte dose d'alcool. La fermentation se fait d'ailleurs très lentement et la température la plus favorable est de 32° à 36° (fig. 65, partie inférieure).

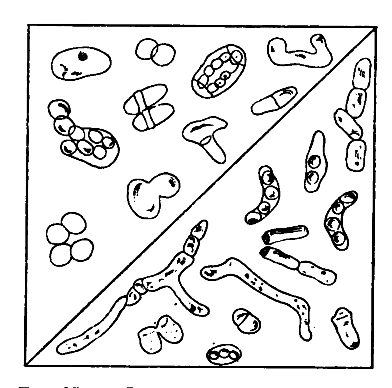


Fig. 65. — Levure octosporus (en haut). Levure Pombe (en bas). D'après Kayser.

Pendant la fermentation, il se produit beaucoup d'acidité (1), et cependant elle est très sensible à l'acidité ; ainsi avec une acidité de 0,1 la chute est de 0,8, avec un acidité de 0,9 elle est de 3,65 ; elle dissout facilement la

(1) Elle gêne à cause de cela les bactéries.

gélatine mais ce qu'il y a de particulier, c'est que cette dissolution s'effectue bien en milieu alcalin ce qui fait admettre que la peptase qui agit dans ce cas n'est pas voisine de la pepsine qui aime les milieux acides, mais de la trypsine qui agit en milieu alcalin.

Enfin elle donne facilement une race peu sporifère.

On a, il y a 5 ou 6 ans, eu les plus grandes illusions sur l'emploi pratique de cette levure en Europe ; il a fallu y renoncer.

β) **Levure octosporus.** — Elle donne 8 spores à la fois. Elle a été trouvée sur le raisin de Corinthe, sur les figues. Elle a pu être isolée facilement car ses spores existent en milieu humide à une température d'environ 115°.

Elle fait fermenter la glucose, la lévulose, très peu la

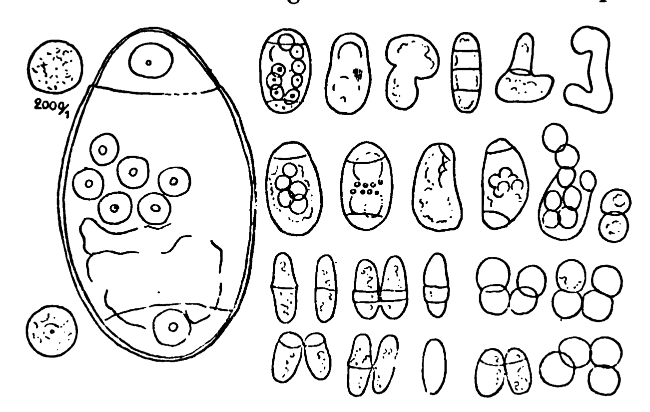


Fig. 66. — Levures octosporus. Spores dont une fortement grossie. D'après Lindner.

maltose et n'agit pas sur la saccharose. Elle donne une variété sans spores très connue que l'on a souvent considérée comme indépendante (fig. 65, partie supérieure, et fig. 66).

12° **Levures non classées.** — *Il existe des levures non classées.*

Les levures sauvages sont allongées et donnent une bière

trouble. Elles sporulent très vite. Elles sont très sensibles à l'effet de la température et leur reproduction est favorisée par une température basse.

Il y en a plusieurs variétés. *La levure rouge* provient soit du lait, soit de la bière, soit des mélasses ou de la paille (on en a décrit provenant de la paille de riz et de la terre des rizières).

13° **Levures asporogènes absolues.** — Nous allons maintenant parler de levures qu'Hansen a distinguées des saccharomyces parce qu'elles ne sporulent pas. Cette distinction est peut-être exagérée car il est parmi elles des espèces très actives comme ferments tandis qu'il y a des saccharomyces qui sont peu actifs.

De plus nous savons qu'on passe facilement de certains sacchomyces sporogènes a des formes asporogènes. On peut toujours supposer que les levures asporogènes proviennent de levures à spores, mais qu'on n'a pas encore découvert les circonstances du passage.

α) **Torulas.** — Levures provenant surtout des germoirs, ou des bâtiments.

Ce sont des cellules à peu près rondes, en chapelets (ou en couronne) ; les plus éloignées de la cellule mère sont les plus petites (fig. 67).

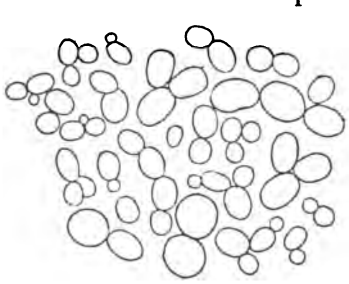


Fig. 67. — Torula. D'après Jorgensen.

Elles sont vacuolées, contiennent souvent des gouttes d'huile (les petites) ou des granulations réfringentes.

Sur gélatine elles donnent des colonies blanches ou glaireuses ; sur les milieux liquides elles peuvent former des voiles (ou des anneaux) (fig. 68).

Il y a quelques grandes cellules qui ne bourgeonnent pas.

Ce sont des espèces très variées, il y en a qui n'invertissent pas la saccharose, d'autres qui l'attaquent.

Elles font fermenter maltose et glucose.

β) **Levure Apiculée (Carpozyma Apiculatus).** — Une des plus importantes levures de ce groupe est le Carpozyma Apiculatus (fig. 69-70).

Cette levure se trouve dans les moûts de raisin au début

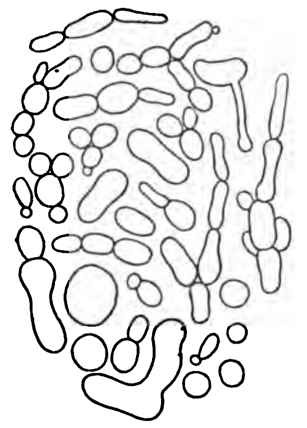




Fig. 68. — Torula (voile).
D'après Jorgensen.

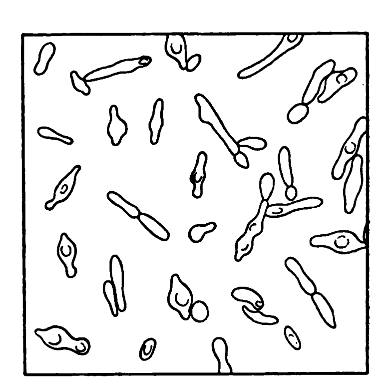


Fig. 69. — Levure apiculée (carpozyma-Apiculatus.
D'après Kayser.

de la fermentation, sur les cerises, les framboises et les fraises. Elle passe l'hiver enterrée. Les premiers bourgeons sont ovales puis les cellules prennent la forme d'un citron terminé par deux apicules.

Les bourgeons ne naissent pas forcément aux deux pôles.

Cette forme en citron disparaît facilement.

Il y a des formes en bâtonnets rappelant les bactéries.

Elle fait fermenter la glucose mais non la saccharose et la maltose.

Elle donne un très faible rendement en alcool et n'en supporte pas plus de 5 pour 100.

γ) **Levures de lait.** — Les levures du lait appartiennent encore à ce groupe.

En général quand on met une levure quelconque dans du lait, elle s'attaque à la caséine, celle-ci est d'abord coagulée puis dissoute. A ce point de vue ce sont les levures

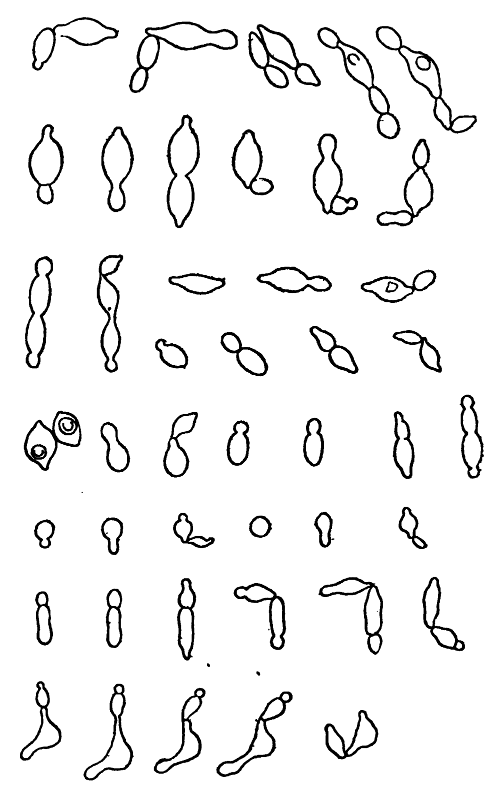


Fig. 70. — Levure apiculée.
D'après Lindner.

qui dissolvent le mieux la gélatine, qui agissent le mieux sur la caséine. L'action est assez lente.

Mais il y a quelques levures qui font fermenter directement la lactose.

Nous citerons les levures (fig. 71) :

	Forme.	Température mortelle à l'état humide.	Température mortelle à l'état sec.
	—	—	—
Kayser (à gauche).	7/4.5 μ	55°	95°
Duclaux (à droite).	rondes, ramifiées	50°	65°
Adametz (en bas).	9/5 μ donne 2 bourgeons aux deux extrémités.	55°	> 100°

δ) **Mycoderma vini et cerevisiæ.** — C'est le micro-organisme de la fleur du vin ou de la bière. Il forme des voiles gras plissés constitués par des cellules rappelant

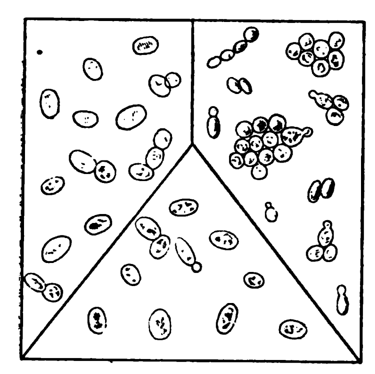


Fig. 71. — Levures de lactose ; à gauche levure Kayser ; au centre levure Adametz; à droite levure Duclaux.
D'après Kayser.

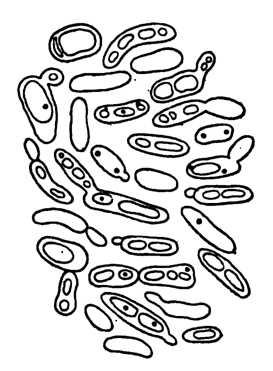


Fig. 72. — Mycoderma cerevisiæ.
D'après Jorgensen.

les levures ramifiées mais plus claires et moins réfringentes (fig. 72).

Quelquefois elles contiennent 1, 2, 3 grains réfringents, ou des vacuoles avec 1 ou 2 globules gras.

Le bourgeonnement a lieu comme pour les levures. On ne connaît pas la sporulation.

Le mycoderma se développe surtout entre 5-15°. Très avide d'oxygène il ne fait pas fermenter les sucres mais les brûle complètement.

Cependant Lasché a obtenu 2,5 pour 100 d'alcool avec certaines espèces.

Il rend les bières troubles.

Origine des levures.

On peut se demander d'où proviennent les levures des fermentations spontanées comme celle du vin, par exemple.

Si l'on examine une fermentation de vin, on trouve de la levure dans le moût. Or le raisin quelque temps avant la récolte ne porte pas de levure sur lui où l'on trouve des dématiums. Certains auteurs pensent que le dématium se transforme en levure. Cette opinion est basée sur le fait que cette moisissure cultivée dans certaines conditions peut donner des cellules courtes sporulant et faisant fermenter. D'autres moisissures, l'aspergillus oryzæ par exemple, paraissent agir de même.

Dans ces derniers temps Klocker et Schiomming ont repris ces études. Ils rejettent les conclusions relatives à l'aspergillus car on serait parti du mélange d'une moisissure et d'une levure. En ce qui concerne le dématium, ils ont bien obtenu des cellules bourgeonnant, faisant fermenter ; mais pour eux ce ne sont pas des saccharomyces car ils n'ont pas vu de spores.

Algues.

Les végétaux de cette classe ont un thalle à chlorophyle ou à pigment coloré; quelquefois ils possèdent les deux sortes d'éléments réunis ; une certaine quantité d'amidon peut également se rencontrer.

Le pigment peut être bleu, jaune ou rouge.

Quand l'algue est à chlorophyle et possède un pigment bleu, la chlorophyle et le pigment sont répartis uniformément dans les cellules.

Si l'algue est à chlorophyle et possède un pigment

jaune ou rouge, la chlorophyle et les pigments sont accumulés dans des sortes de noyaux qui se scindent eux-mêmes lorsque les cellules se scindent.

Les algues vivent en général dans l'eau. Celles dont nous avons à nous occuper vivent sur des matières organiques plus ou moins à l'état de dissolution.

Les algues peuvent se reproduire par scissiparité, par spores intérieures et par spores extérieures.

Enfin la reproduction par œufs existe également, mais la plupart des espèces nous intéressant ne se reproduisent pas ainsi.

Pour l'étude on divise les algues d'une façon un peu artificielle :

Les algues	*vertes*	dites	*chlorophycées*	qui ont des œufs.
—	*jaunes*	—	*phéophycées*	
—	*rouges*	—	*érythrophycées*	
—	*bleues*	—	*cyanophycées*	

Algues vertes.

Parmi les *algues vertes* quelques-unes seulement ont de l'intérêt pour nous.

Euglene viridis. — L'*Euglene viridis* a la forme d'une outre avec un cil. Elle est formée d'un thalle qui se cloisonne par scissiparité et forme de nouvelles cellules qui s'isolent. A l'intérieur de ces membranes cellulaires se trouve un protoplasma où l'on aperçoit les grains d'une matière à laquelle on a donné le nom de *paramylon*. Ils ont la forme de l'amidon de blé mais ne paraissent pas posséder tous les caractères chimiques de l'amidon. Voyons la reproduction par spores de l'Euglène.

Les spores se produisent de la façon suivante : à un certain moment les cellules donnent naissance et la liberté à des sortes d'animalcules mobiles ayant un cil vibratil et appelés zoospores. Celles-ci se meuvent parce

que, non entouré d'une membrane cellulosique, le protoplasma peut s'agiter. Plus tard une membrane de cellulose se forme et la zoospore devient fixe et prend le nom de spore. Une fois arrêtée, la spore se cloisonne à son tour et la reproduction continue par scissiparité.

Cette algue est une de celles qui jouent un des rôles les plus importants dans la putréfaction des matières azotées.

Protococcus. — C'est cette poussière verte qui pousse partout sur la terre humide. Son thalle est formé d'une seule cellule sans cloison qui contient un grand nombre de noyaux colorés en vert. Elle donne naissance par un procédé analogue au précédent à un grand nombre de zoospores à deux cils. Ces zoospores restent mobiles dans l'eau pure. Mise à l'air ou dans les eaux salines, la zoospore se fixe parce que la membrane cellulosique se forme.

Cette plante joue un rôle important dans la putréfaction.

Parmi les algues jaunes et rouges aucune ne nous intéresse.

Algues bleues.

Les *algues bleues* ont un thalle formé d'un petit filament.

Elles peuvent se reproduire par spores extérieures ou *kystes,* c'est le cas des *nostocacées,* ou bien par spores intérieures ou *spores* proprement dites. C'est le cas des *bactériacées.*

Nostocacées. — **Leuconostoc mesenteroïdes.** — Dans ce groupe on trouve le leuconostoc mesenteroïdes, on l'appelle ainsi parce que, examiné au microscope, il présente l'aspect bien connu d'une masse intestinale (fig. 73).

Comment cette apparence est-elle produite?

Les cellules arrondies sont rangées en grands chapelets

plus ou moins contournés et entourés d'une sorte de gelée qui est le résidu du mycélium. La membrane de ces cellules est très mince. Le protoplasma est sans noyau et il est imprégné de chlorophyle et de pigments bleus.

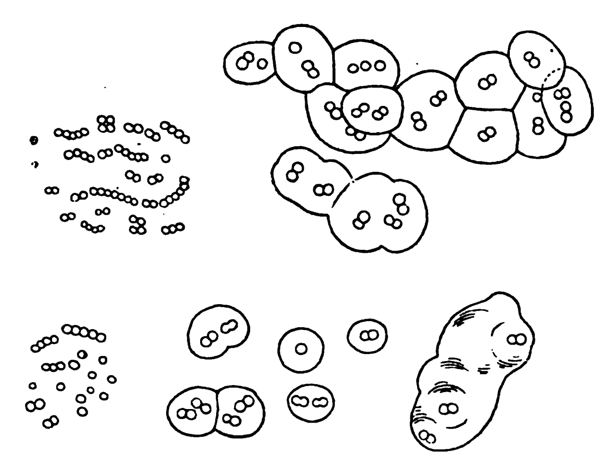


Fig. 73. — Leuconostoc mesenteroïdes. D'après Lindner.

Si on regarde attentivement, on aperçoit de loin en loin dans les chaînes, des cellules plus grosses sans protoplasma, à parois plus épaisses et jaunâtres tandis que le reste de la plante est à peine bleuâtre. A part ces cellules, toutes les autres se reproduisent par scissiparité, en se subdivisant en deux et c'est l'allongement ainsi produit qui oblige les chaînes à se contourner.

En général les cellules qui se forment ainsi s'intercalent et restent unies à la chaîne qui ne se rompt pas. Quelquefois cependant un morceau se sépare et devient une véritable bouture. Enfin toutes les cellules, même les jaunes, donnent des kystes. La reproduction par œuf n'a pas lieu.

Lorsqu'on met le leuconostoc mesenteroïdes dans une solution de saccharose il se produit les phénomènes suivants :

1° Une partie de la saccharose est transformée en maltose;

2° Une autre partie s'hydrate et tend à s'invertir. L'inversion n'a pas exclusivement lieu en glucose et en lévulose; il y a formation en même temps d'arabinose:

$$5C^{12}H^{22}O^{11} + 5H^2O = 12C^5H^{10}O^5.$$

Cela présente des inconvénients en sucrerie, mais ne présente guère d'intérêt en distillerie.

Bactériacées. — La reproduction se fait par spores internes et par scissiparité. La forme des bactériacées est assez difficile à décrire vu leur petitesse. En outre elles sont entourées d'une gelée, résidu du mycélium, ce qui en rend les contours indécis. Cette gelée peut être spéciale à chaque bactériacée ou bien commune à un groupement.

Dans la première catégorie se trouvent les micrococcus, les bactéries, certains bacilles, etc.

Dans la deuxième catégorie on trouve les torulas, cellules réunies en forme de chaîne (streptocoque de l'érysipèle, par exemple).

D'autres fois comme dans le cas des sarcines l'amas est constitué par 4 ou 8 cellules disposées en carré ou en cubes. Dans les staphylocoques (furoncles, etc.) les cellules se présentent sous forme de grappes, enfin dans les zooglées l'ensemble est absolument informe.

Des bactériacées les unes sont mobiles, les autres immobiles.

Parmi les immobiles nous citerons les *micrococcus* et un certain nombre de bacilles (bâtonnets).

Parmi les mobiles nous citerons certains bacilles et les bactéries.

Souvent on voit des cils mobiles rattachés aux bactériacées, ce ne sont pas des cils vibratils, ce sont seulement des filaments de la gelée extérieure qui se trouvent entraînés.

Sur la constitution des bactériacées, les travaux définitifs manquent; l'hypothèse la plus vraisemblable est celle de Butschli qui fait un véritable noyau du corps central qui se trouve toujours dans une bactérie à l'intérieur du protoplasma. Cette manière de voir est basée sur l'action des colorants.

La plus grande objection qu'on y ait faite est la grandeur démesurée de ce noyau par rapport à celle de la cellule, surtout dans les bactéries proprement dites.

Composition chimique. — La composition chimique des bactériacées est assez difficile à déterminer car il faut que la culture étudiée soit pure et soit formée d'individus du même âge. La présence de la gelée est encore une cause de trouble dans les résultats.

Le milieu de culture joue un rôle considérable sur la teneur en matières azotées, grasses ou minérales.

Il semble que la membrane soit de nature cellulosique.

Il y a des matières albuminoïdes, des diastases, de la xanthine, de la guanine, de l'adénine, de l'urée. Il y a encore de la lécithine et des matières grasses.

Mais l'étude de cette question est à peine ébauchée.

Physiologie des bactériacées. — Alimentation des bactériacées. — Il faut remarquer que les bactériacées, classées parmi les algues, ne devraient pas être parasites. Il semble cependant que la plupart d'entre elles le soient.

Elles se rapprochent donc sous ce rapport des champignons. Nous avons vu que certaines levures se reproduisent par un mode de bourgeonnement voisin de la scissiparité. Ces levures, et les bactériacées parasites forment en définitive un groupe de transition entre la classe des champignons et celle des algues.

L'alimentation des bactériacées est très comparable à celle des moisissures. Cependant elles préfèrent les milieux neutres ou alcalins aux milieux acides.

On trouve souvent de l'oxyde de fer dans leur alimen-

tation. C'est là la cause de certains dépôts ferrugineux ; en effet certaines bactériacées absorbent du protoxyde et rendent du sesquioxyde de fer. D'autres bactériacées absorbent de l'hydrogène sulfuré provenant de l'action des matières en putréfaction sur les sulfates. Ces bactériacées s'assimilent le soufre et rendent des sulfates. L'alimentation hydrocarbonée des bactériacées devrait consister, si elles n'étaient pas parasites, en une absorption d'acide carbonique et d'eau. Ce phénomène existe peut-être concurremment avec le parasitisme, mais il n'a pas été observé directement.

En réalité l'alimentation hydrocarbonée des bactériacées est analogue à celle des moisissures. Cependant elles semblent moins difficiles que celles-ci.

Au point de vue de la respiration les bactériacées sont ordinairement aérobies si on considère le sens du phénomène. — En fait, il y a une dose déterminée d'oxygène qui convient à chaque espèce. Cette dose peut être sensiblement nulle. C'est par exemple le cas de la bactérie butyrique anaérobie de Pasteur.

Si on fait une culture d'un mélange de lait, de sucre et de craie en ensemençant avec du vieux fromage, au début il se développe du ferment lactique aérobie ; puis quand tout l'oxygène a été absorbé par ce microbe il se développe alors du ferment butyrique.

Influences diverses sur les bactériacées.—Electricité. — L'électricité paraît sans action du moins tant qu'elle n'électrolyse pas le milieu.

Dans ce cas, un certain nombre d'auteurs ont reconnu autour des pôles des régions bactéricides si les produits dégagés sont antiseptiques (ozone), ou des régions où les bactéries ne se développent pas par suite du changement de composition du milieu.

Chaleur. — La température de 0° arrête toute végétation ; 100° tuent toutes les bactériacées.

En général, dix minutes de chauffage entre 50-65° suffisent pour les tuer.

L'optimum est ordinairement entre 30° et 40°, mais souvent les bactériacées sont excessivement sensibles à une légère variation de température. Par exemple la bactérie du charbon (bacterium anthraxis) qui est très virulente à 36°, cultivée à 42°, perd la faculté de sporuler et produit un virus tellement atténué qu'il sert de vaccin ; à 45° la scissiparité elle-même disparaît.

La bactérie butylicus qui fructifie encore à 42° dans la glycérine est inactive à 45°.

Les spores résistent mieux d'ailleurs que les bactériacées. Il y en a qui résistent à 120° ; en présence de l'eau elles sont ordinairement tuées à 50-55° (2 heures). C'est le cas du micrococcus ureæ, tandis que le bacille ureæ n'est tué qu'à 95°. (D'où la méthode de séparation déjà indiquée par chauffage à 80°.)

La nature du liquide et surtout son acidité influencent l'expérience, en ce sens que les spores se développent mal en milieu acide.

Les spores des bactériacées résistent en général à la putréfaction. Les spores de la bactérie charbonneuse provenant des cadavres enterrés résistent 12 et 15 ans.

Lumière. — En général la lumière tue au bout d'un certain temps les microbes ; elle fait souvent disparaître la propriété de donner des pigments colorés.

Il y a d'ailleurs une sensibilité personnelle à chaque espèce.

Ce sont surtout les rayons chimiques qui sont actifs.

C'est ainsi qu'un fort arc électrique agit très nettement.

Il faut tenir compte de l'effet d'échauffement qui se superpose à l'effet lumineux et nous savons qu'un demi-degré au delà de la limite suprême de température peut être mortel.

L'action de la lumière (heure, jour, mois, état du ciel, éclairement de la chambre, etc.) a une action évidente.

La lumière diffuse paraît très peu active.

Une expérience de Buchner relative à ce sujet est fort élégante. On ensemence avec une bactérie un bouillon de gélose glucosé et liquide, on mélange le tout, on met dans une boîte de Petri.

Quand le milieu est solide, on retourne la boîte et on pose sur le fond un écran à découpures.

On laisse au soleil 1 à 2 heures, ou à la lumière diffuse de 5 à 10 heures suivant les espèces. On place à l'étuve et au bout de 24-36 heures on voit les découpures apparaîtrent limpides sur un fond nébuleux. — C'est que là où les découpures ont laissé passer la lumière, les germes ont été tués et ont laissé la gélose intacte tandis que le reste s'est altéré.

On peut d'ailleurs faire l'expérience inverse en posant sur la boîte des lettres découpées ; elles apparaîtront en blanc.

Lorsque les bactéries sont desséchées leur résistance à la lumière est plus grande. Cette résistance dépend naturellement de la nature du milieu et de l'action de l'air qui agit et sur le milieu (1), et sur le microbe. En général, l'action de la lumière est aidée par l'air.

Reproduction des bactériacées. — Elle se fait par spores ou par scissiparité.

Sporulation. — A un certain moment, dans les bactériacées, on voit se former des grains réfringents, qui grossissent et fusionnent en une masse s'entourant d'une fine membrane, laquelle ne tarde pas à s'épaissir.

---

(1) M. Duclaux a en effet montré la saponification des corps gras, l'oxydation des sucres en milieux alcalins; dans les deux cas il se forme de l'acide formique.

M. Richardson a montré la présence d'eau oxygénée.

Il y a des cas où les spores se placent suivant l'axe de la bactériacée, d'autres où elles s'accumulent à un pôle (blastidium).

La membrane de la bactériacée se dissout ou se résorbe dans le milieu et la spore devient libre. Alors celle-ci grossit, s'allonge et sa membrane s'éclaircit.

Une hernie se forme, par exemple, à une extrémité, on voit une masse hyaline (et non d'aspect gras comme la spore), entourée d'une membrane ténue, qui s'allonge ; en quelques heures elle a pris une longueur quadruple de celle de la spore et commence à se segmenter.

Pendant ce temps, la membrane de la spore s'est elle-même résorbée.

Souvent la spore, au lieu de germer par un bout, germe en deux pôles, d'autres fois il y a une germination équatoriale.

Ordinairement, comme les bactériacées sont agglutinées dans une gelée, les spores se trouvent elles-mêmes agglutinées dans la gelée et y restent.

Scissiparité. — Voyons maintenant la reproduction par scissiparité. Dans ce cas, la cellule s'allonge, le protoplasma devient plus clair et il se forme intérieurement une cloison. Les deux parties de la bactériacée, ainsi déterminées, constituent chacune une nouvelle bactériacée. Il s'en forme ainsi 4, 8.... Souvent les cellules ainsi formées restent groupées et forment des chaînes. D'autres fois, des morceaux, véritables boutures, se séparent pour former de nouvelles chaînes.

Vitesse de reproduction. — On peut se demander quelle est la vitesse de reproduction des bactériacées. Nous allons prendre pour exemple la bactériacée qui a servi pour cette étude, le bacterium racemosus. Cette bactériacée mesure 10 μ. On peut évaluer la vitesse de reproduction de deux manières :

1° En admettant que tous les articles ont même lon-

gueur et que chaque individu en produit deux, la mesure de la longueur totale au bout d'un temps déterminé conduit à la connaissance du temps nécessaire pour le dédoublement d'un individu.

En effet soient t minutes ce temps.

T — la durée de l'expérience.

λ la longueur d'un microbe.

L la longueur observée.

Après chaque période de t, chaque individu s'est dédoublé. Or il y a $\frac{T}{t}$ périodes considérées, donc au bout du temps T, un individu en a produit $2^{\frac{T}{t}}$.

Ce qui réprésente une longueur $\lambda 2^{\frac{T}{t}} = L$.

Donc $$\frac{T}{t} = \frac{\log L - \log \lambda}{\log 2},$$

$$t = \frac{T \log 2}{\log L - \log \lambda}.$$

Pour le microbe considéré $\lambda = 10\,\mu$,

L pour un temps de 280 minutes est $1960\,\mu$.

Donc $$\frac{280 \log 2}{\log 1960 - \log 10} = t = 35.$$

Ce qui donne pour l'espèce considérée la vitesse moyenne de 35 minutes.

2° On peut évaluer autrement la vitesse de reproduction. La méthode consiste à employer des dilutions faibles où l'on puisse compter les bactéries. On les compte au début et à la fin de la fermentation. Cela exige que l'opération ne soit pas poussée trop loin et que toutes les bactéries se soient reproduites par scissiparité. Au début on a a bactéries sous le microscope. Après n générations on en trouve b. Si toutes les bactéries se sont dédoublées,

on a $$b = a \times 2^n$$

$$\log b = \log a + n \log 2,$$

d'où
$$n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}.$$

Si l'opération a duré un temps T, chaque génération a demandé un temps $\frac{T}{n}$ pour se reproduire. On trouve $\frac{T}{n} = 35$ minutes environ (1). Les deux méthodes sont donc d'accord.

Avec la levure, on a trouvé une vitesse de reproduction de 40 minutes.

Classification morphologique. — On devrait classer les bactériacées d'après leur forme ; mais étant données leur petitesse et les variations de formes, la classification morphologique est impossible. On a cependant essayé de les grouper de la façon suivante (fig. 74) (2) :

I. Sphérobactériacées. — Ces bactériacées sont rondes (3) ; leur dimension varie de 1 à 3 μ. Elles sont immobiles et on n'en connaît pas les spores. Elles sont souvent isolées et forment alors le groupe des *coccus* ; d'autres fois elles sont rassemblées en chaînes et sont alors appelées *streptococcus*. Certaines de ces bactériacées en chaînes jouent un rôle important en pathologie, comme par exemple le streptocoque de l'*érysipèle*. Les coccus peuvent être

---

(1) Si on admet cette vitesse moyenne, il est facile de voir qu'au bout d'un temps assez long, le nombre des bactériacées produites est véritablement énorme.

Aussi au bout de 12 heures = 20 périodes de 35 minutes, 1 bactériacée aura donné 2^{20} individus soit 1 050 000 mesurant une longueur totale de 10 500 000 μ ou de $10^{m},50$.

(2) Légende de la figure 74 ; *a*) coccus ; *b*) diplococcus ; *c*) streptococcus ; *d*) bacilles et bactéries ; *e*) leptothrix ; *f*) bactéries sporulant ; *g*) zooglée ; *h*) et *i*) formes d'involution ; *j*) spirilles ; *k*) germination des spores ; *l*) bacilles ciliés.

(3) Cependant le diplococcus de la pneumonie est formé de deux coccus elliptiques ; le coccus de Boutroux est oblong.

réunis par groupe de 4 ou 8 formant un carré (*meriste* ou *pediococcus* ou un cube (*sarcine*) (fig. 75). Enfin elles peuvent être agglomérées d'une façon quelconque en *zooglées*.

II. **Microbactériacées.** — Ces bactériacées sont formées de bâtonnets d'une longueur de 2 à 20 µ et d'une largeur

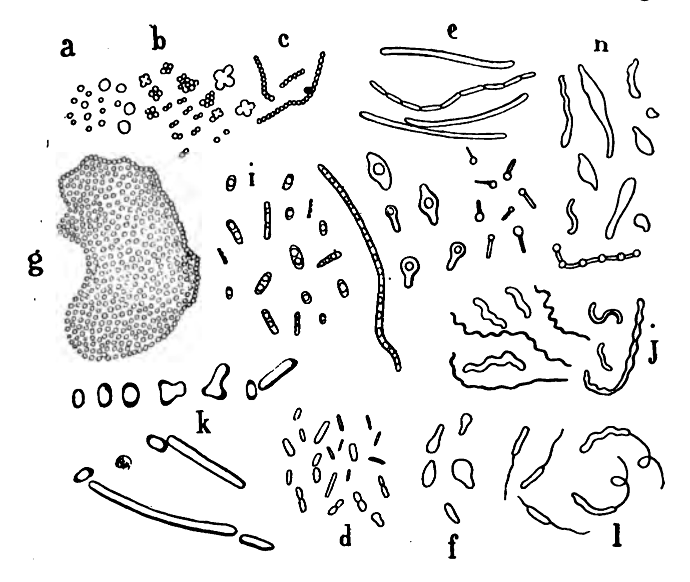


Fig. 74. — Formes diverses de Bactériacées.
D'après Jorgensen et Lindner.

de 2 à 5 µ. Elles sont en général mobiles. Elles sont isolées, quelquefois elles sont réunies par deux ou par trois. On distingue d'ailleurs deux formes, les *bactéries* proprement dites, qui ont une forme cylindrique, et les *clostrydiums*, qui ont un renflement.

III. **Desmobactériacées.** — Se présentent sous forme de filaments allongés, véritables fils.

Les unes sont plus ou moins droites et forment les *bacilles*.

Les autres sont ondulées et forment les *vibrions*.

Les *bacilles* sont soit mobiles, soit immobiles et sont

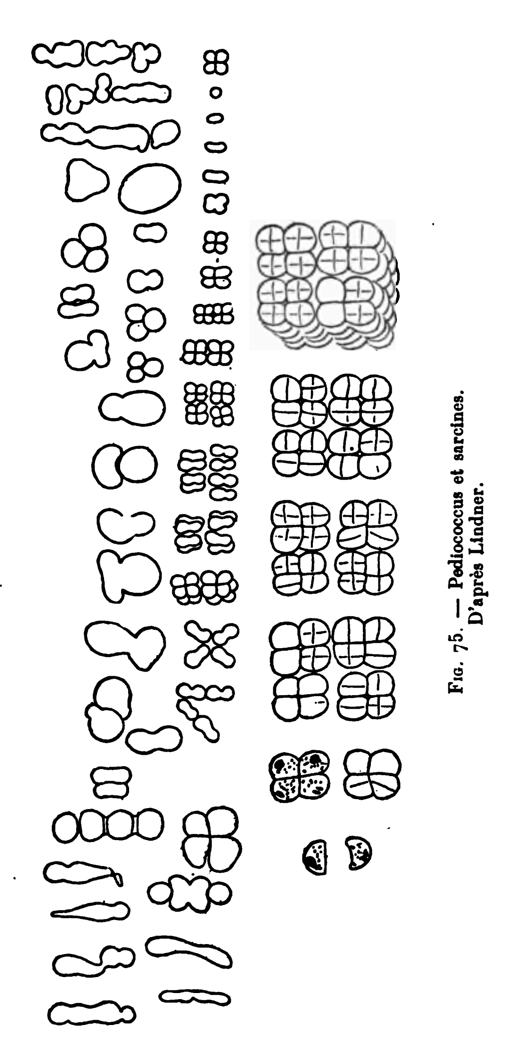


Fig. 75. — Pediococcus et sarcines. D'après Lindner.

isolés ou réunis en chaînes très longues. On appelle souvent ces chaînes des *leptothrix*.

Les *vibrions* sont toujours mobiles.

IV. **Spirobactériacées** ou spirilles. Elles ont la forme d'une hélice et possèdent un mouvement de torsion sur elles-mêmes.

Il est impossible de se servir de cette classification pour faire l'étude des bactériacées. On ne voit pas, par exemple, quelle différence bien nette sépare le bacille de la bactérie.

Classification d'après la constitution chimique. — Produits élaborés par les bactériacées. — Pendant la végétation, les bactériacées tendent à produire une série de corps particuliers et spéciaux à chaque bactériacée.

Il y a des bactériacées qui sont appelées *amylogènes* parce qu'elles produisent de l'amidon. Ce n'est pas de l'amidon à proprement parler. Les bactériacées sont infiniment plus petites que les grains d'amidon, mais elles renferment des produits solubles colorés en bleu par l'iode.

D'autres produisent des diastases : par exemple le *bacille amylobacter* peut invertir la saccharose, l'amidon, la cellusose ; le *micrococcus ureæ* donne une diastase qui intervient dans les fermentations ammoniacales.

On en connaît qui sont généralement rougeâtres et qui peuvent produire du soufre, on les appelle *thiogènes*.

Elles se nourrissent en effet d'hydrogène sulfuré, assimilent du soufre et rejettent des sulfates.

D'autres sont ferrugineuses, elles absorbent du protoxyde et rendent du sesquioxyde. Les bactéries phosphorescentes qui causent la phosphorescence des poissons produisent une matière capable de devenir phosphorescente par oxydation. Les bactéries chromogènes produisent des couleurs qui ne diffèrent pas beaucoup des matières colorantes de l'aniline. Telle est, par exemple, la bactérie pyocyanique du pus bleu.

La coloration rougeâtre que prend quelquefois le lait est due au micrococcus miraculosus.

Cette classification n'établit pas des catégories assez nombreuses pour être utile. De plus, la nature des produits élaborés par les bactéries varie avec les circonstances.

Classification d'après la nature des produits des fermentations. — C'est la classification habituellement suivie ; elle est loin d'être parfaite, car on verra qu'une même bactérie qui dans certaines conditions donne, par exemple, de l'acide butyrique, peut donner autre chose dans d'autres conditions. Ce sera donc une classification artificielle.

On divise ordinairement les bactériacées en :

bactériacées hydratantes,
— oxydantes,
— réductrices,
— de dédoublement.

Nous ajouterons un chapitre : bactériacées à fonctions mal étudiées.

I. **Bactériacées hydratantes.** — Ces bactériacées sont capables de fixer de l'eau sur certains corps.

Hydratation de l'urée. — L'urée a pour formule $CO\langle{}^{AzH^2}_{AzH^2}$. Cette urée peut être transformée par fixation d'eau en carbonate d'ammoniaque $CO\langle{}^{OAzH^4}_{OAzH^4}$. Ce carbonate d'ammoniaque joue un grand rôle dans les fermentations dites ammoniacales. Cette fixation d'eau est due à des microbes ou à des plantes macrobiennes.

Parmi ces plantes, il y a une mousse qui se trouve en dehors du cadre de la microbiologie telle qu'on l'a définie. En outre on trouve le micrococcus ureæ et quatre bacilles.

Nous ne parlerons que du micrococcus.

Le *micrococcus ureæ* a été découvert par Pasteur en

1860. L'urine en putréfaction laisse déposer un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien. Pasteur en avait conclu que dans cette urine devait se former de l'ammoniaque. Il reconnut qu'une partie de cette ammoniaque est due au *micrococcus ureæ* qui agit surtout à 35° par l'intermédiaire d'une diastase. Ce micrococcus ureæ n'agit donc pas d'une manière différente de la levure qui produit l'invertine. Le micrococcus ureæ, qui vit bien sur l'urée, peut également se développer sur l'acide hippurique.

L'amidon, les sucres, la glycérine, les savons de soude sont les meilleurs aliments du micrococcus ureæ.

Autres bactériacées hydratantes. — Tyrothrix du lait. — On sait que la *trypsine*, qui a pour origine le suc pancréatique, peut dissoudre la caséine. Il existe dans le lait des microbes les *tyrothrix* qui émettent de la trypsine.

Ils se présentent sous forme de bâtonnets mobiles très petits, de 3 μ sur 0,5 μ et qui forment sur le lait un voile qui se résout en spores. La plupart de ces microbes résistent à des températures élevées, quelques-uns à 100° ; leurs spores en milieu alcalin résistent à 115-120°, suivant les espèces.

Putréfactions. — Les matières organiques azotées se transforment sous certaines influences en donnant, entre autres choses, des matières gazeuses nauséabondes. C'est la putréfaction pour les viandes mortes, la maladie pour les viandes vivantes.

Ce phénomène se produit sous l'influence de deux sortes de microbes.

Les premiers sont *aérobies*. Ils ont pour fonction :

1° D'absorber l'oxygène du milieu où est la viande ;

2° D'achever la destruction de cette viande en mangeant les résidus de la seconde catégorie de microbes.

Les seconds sont *anaérobies* et produisent, aux dépens de la viande, certaines décompositions dont les résidus sont absorbés par les premiers microbes.

Les microbes aérobies se mettent à la surface du corps qui va se putréfier. Ils forment des zooglées. Ils sont assez différents les uns des autres. Les uns sont des bactériacées véritables, les autres des champignons.

Parmi les bactériacées se trouve une série de bactéries appelées *bacterium termo*. Ce sont de petits bâtonnets formant des chaînes plus ou moins contournées. La plus connue de ces bactéries, cultivée sur gélatine, donne des colonies d'un jaune sale, à bords mats (1).

Parmi les champignons on trouve le *monas lens*. Ce champignon appartient au groupe des oomycètes, parce qu'il a une membrane et n'est pas cloisonné ; mais on ne lui connaît pas d'œufs, ce qui le rapproche des myxomycètes.

A un moment donné, ce champignon donne naissance à des zoospores à un cil. Ces zoospores rencontrant une cellule de l'objet à putréfier s'y fixent, s'entourent d'une membrane de cellulose et un individu parfait se trouve ainsi constitué.

Les microbes anaérobies sont en très grand nombre : il y a des bactéries (2), il y a des algues vertes, telles que l'euglène viridis et le protococcus.

La putréfaction est en définitive une hydratation.

On trouve parmi les produits obtenus après putréfaction : de l'acide carbonique, de l'azote, de l'hydrogène, de l'ammoniaque, des hydrogènes phosphoré et sulfuré, tous les acides gras, de l'acide oxalique, du phénol, de l'indol, un corps qui dérive de celui-ci, le β méthyl-indol ou skatol, cause de la mauvaise odeur, de la glycocolle, de la leucine, de la tyrosine et une série d'alcaloïdes (pto-

(1) Le B. Coli permet le développement de certaines bactéries de la putréfaction, mais ne semble pas jouer un rôle direct.

(2) Entre autre une bactérie en forme de baguettes de tambour.

maïnes). Au début la viande putréfiée est acide (excepté celle de poisson), à la fin elle est alcaline.

Bactériacées oxydantes. — Nous placerons en tête celles qui causent la fermentation acétique.

Bactéries acétiques. — Actuellement, on connaît au moins six microbes produisant l'acide acétique au moyen de l'alcool. Il s'agit bien ici d'une oxydation. Ces microbes sont tous des bactéries et portent les noms suivants :

Bacterium aceti, bacterium pastorianum, bacterium kutzingianum, bacterium oxydans, bacterium acetosum,

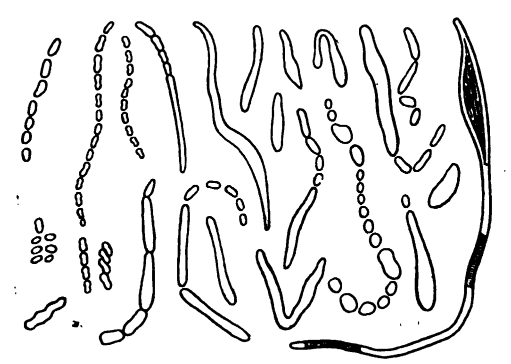


Fig. 76. — **Bacterium aceti et pastorianum. D'après Jorgensen.**

bacterium acetigenum. La fig. 76 représente à gauche le 1er et à droite le 2e de ces microbes.

La première bactérie est la plus anciennement connue. C'est la plus abondante dans le voile du vinaigre. Elle est formée de longs chapelets de bâtonnets légèrement étranglés par le milieu. Si on examine ces chapelets au microscope, on a l'apparence d'une chaîne de coccus. Ces bâtonnets sont très petits (3 μ sur 1,5 μ). Les chaînes s'enchevêtrent et produisent le voile.

Souvent, dans les cultures à une température élevée, des cellules tendent à devenir plus grandes. Ce sont les cellules géantes du vinaigre.

De plus, le voile prend un aspect particulier, il devient glaireux et tend à se marbrer.

Les autres espèces ont été distinguées par différents caractères analogues à ceux qui ont servi à différencier les races de levure. En particulier, on a utilisé l'aspect des cultures sur gélatine et celui de la gelée qui entoure les colonies.

Ainsi, pour le bacterium aceti, la gelée contient une substance qui bleuit par l'iode, tandis que dans le bacterium pastorianum et le bacterium kutzingianum il n'existe pas d'amidon ; l'aspect du voile sert également. Dans le bacterium aceti, le voile est glaireux, uni et tend à se marbrer. Dans le bacterium pastorianum, le voile est sec, ridé et très épais. Dans le bacterium kutzingianum, le voile est sec, ridé et tend à monter le long des parois du vase. Dans le bacterium oxydans, le voile est très fin et se déchire par agitation. Dans le bacterium acetosum, le voile est épais et l'agitation ne le déchire pas. Au-dessous du voile de l'oxydans, le liquide est trouble tandis qu'il est clair au-dessous du voile de l'acetosum.

Dans l'acetigenum, le voile est mince, glaireux et tend à tomber.

Dans les autres espèces, le voile est très feutré et tend à nager.

Tous ces bacteriums sont généralement immobiles, sauf le dernier ; ils vivent dans l'eau de levure, le moût de bière, le bouillon de gélatine et peuvent se nourrir de sulfate d'ammoniaque, de tartrate d'ammoniaque, de peptone, d'asparagine, de nitrate de potasse.

Tous ces microbes oxydent l'alcool ordinaire et donnent de l'acide acétique à une température optimum de 26-29°, sauf quelques exceptions.

L'acetosum donne encore beaucoup d'acide acétique à 15°.

L'acetigenum en donne beaucoup à 33°.

Naturellement il se passe ici ce qui se passe pour les levures. La concentration primitive du moût a une influence.

Le Bacterium	acetosum supporte un milieu contenant	11 o/o	d'alcool.
—	pastorianum et kutzingianum	—	9 o/o	—
—	oxydans	—	7 o/o	—
—	acetosum	—	5 o/o	—.

Une addition de 3 pour 100 d'acide acétique ou de 1/4 pour 100 d'acide phosphorique ou de 1/10 pour 100 d'acide chlorhydrique empêche radicalement le développement. Des additions moindres le gênent seulement. Les doses de ces additions gênantes sont du reste variables avec les espèces.

De même que dans les fermentations par la levure, la dose d'alcool produit joue un rôle dans la marche de la fermentation, la dose de l'acide acétique obtenu a aussi une influence.

Par exemple, les bacteriums aceti, kutzingianum, acetosum supportent 6,6 pour 100 d'acide acétique, l'acetigenum n'en supporte que 2,7 et l'oxydans que 2.

Les ferments acétiques qui jusqu'ici sont pour nous des ferments oxydants de l'alcool ordinaire sont des oxydants d'un grand nombre de corps.

Les races aceti, pastorianum, kutzingianum, oxydent la glucose, l'alcool propylique. L'acetosum oxyde en outre l'arabinose et la galactose. L'oxydans oxyde en plus la lévulose, la maltose, les dextrines, l'érythrite, la mannite.

Aucun de ces microbes n'oxyde l'alcool méthylique, mais ils oxydent l'acide acétique lui-même ; l'oxydans du moins fait exception.

Emploi dans la pratique. Fabrication du vinaigre (1). —

(1) D'après Rothenbach, lorsque la fabrication de l'acide acétique est active (formation de 12 à 14 pour 100), c'est que le milieu est pauvre en extrait — et alors il ne se forme pas de voile. C'est le B. aceti qui est le plus abondant.

On peut fabriquer du vinaigre avec tous les corps renfermant de l'alcool. Le vinaigre d'Orléans est fait avec du vin. Dans des tonneaux ordinaires on met 1 hectolitre de vin, on ajoute 10 litres de vinaigre fait et une cuiller de voile de vinaigre. On laisse fermenter et 8 jours après on ajoute 10 litres de vin. On marche ainsi jusqu'à ce que le tonneau soit plein. 5 jours après on soutire 10 litres qui sont du vinaigre marchand et on les remplace par 10 litres de vin nouveau et ainsi de suite.

Pasteur a cherché à rendre cette méthode plus rapide. Il a proposé la fermentation dans des cuves plates et couvertes en ensemençant avec un voile entier. L'opération est 3 fois plus rapide que la précédente. Cependant le procédé Pasteur n'a pas pris d'extension parce que les pertes par évaporation sont trop grandes.

Dans les pays où il n'y a pas de vin on fait le vinaigre avec de l'alcool (1).

En Allemagne, le procédé consiste à faire couler dans un milieu aéré de l'eau alcoolisée sur des copeaux de hêtre. L'écoulement de l'eau est très lent ; mais la fabrication marche assez rapidement. L'appareil se compose d'un tonneau à 2 faux fonds perforés entre lesquels se trouvent des copeaux de hêtre ; le faux fond supérieur est bouché par des nœuds de corde faisant clapets empêchant l'écoulement trop rapide de l'eau alcoolisée que l'on place à la partie supérieure du tonneau ; l'air circule de bas en haut dans le tonneau ; le liquide acidulé sort par un siphon placé sous le faux fond inférieur.

Ferment gluconique de Boutroux. — Ce ferment possède une particularité. Il est à noyau, c'est un coccus un peu allongé (micrococcus oblongus), isolé ou en chaînes.

(1) En Angleterre on fait du vinaigre de moût de malt très concentré ; il est très recherché pour assaisonner certains condiments.

Il forme des voiles blancs sur les milieux sucrés. Il se développe bien dans les milieux contenant de la chaux. Il attaque la saccharose après inversion et la glucose à 30-35°. Le résultat est une oxydation de la glucose. En formant de l'acide gluconique, la dose de cet acide supportée par le microbe est très faible. Si on neutralise l'acide au fur et à mesure de sa formation, la réaction continue, sinon elle s'arrête. En particulier, dans un milieu contenant de la chaux, il se forme non pas de l'acide mais du gluconate cristallisé et la fermentation peut se prolonger longtemps.

Ferment de la Sorbose de Bertrand. — Dans le suc des sorbes, il y a de la sorbite, mais souvent on peut extraire un sucre réducteur, la sorbose ; cette extraction est assez irrégulière. En voici la raison :

Le jus de sorbe abandonné à lui-même, subit la fermentation alcoolique due à la glucose, puis plus tard la fermentation acétique en même temps que l'alcool disparaît. La sorbose n'existe pas encore. Elle prend naissance lorsque certaines mouches rouges viennent se poser sur le voile du ferment acétique. Ces mouches apportent en effet le microbe qui fait apparaître la sorbose.

Ce microbe est une bactérie de 2 à 3 μ sur 0,5 μ et constitue sur la culture un voile pris longtemps pour celui de la bactérie acétique qui a précédé, mais qui est verdâtre.

Si on la cultive dans tous les alcools correspondant à la mannite, le glycol, la glycérine, la xylite, etc., on obtient la formation des sucres cétosiques correspondants; avec la glycérine on a la dioxycétone (1).

---

(1) MM. Bertrand et Emmerling ne sont pas éloignés de croire que cette bactérie de la sorbose est le bactérium xylinum de Brown.

Emmerling a étudié la nature des membranes de ces 2 sortes de bactéries, il a trouvé comme dans la levure une substance chitineuse.

Dans ces derniers temps, M. Bertrand a obtenu de l'érythrite naturelle, un sucre cétonique qu'il nomme l'érythrulose.

Si on la cultive dans des sucres réducteurs, xylose, arabinose, galactose, glucose, on a par oxydation de l'acide monobasique correspondant tel que l'acide gluconique $CH^2OH(CHOH)^4CO^2H$; si on insiste avec la glucose on a un nouvel acide qui parait être

$$(CH^2OH)(CHOH)^3C.CO^2H.$$

Ferments nitreux et nitrique. — Les matières organiques transformées d'abord en ammoniaque tendent à se transformer dans le sol en acide nitrique.

Schlœsing et Müntz ont pensé que le phénomène est microbien car il n'a pas lieu en présence de chloroforme.

Winogradsky a trouvé des bactéries donnant de l'acide nitreux AzO^2H, aux dépens de l'ammoniaque et de l'acide nitrique AzO^3H aux dépens de l'acide nitreux.

Bactériacées réductrices. — Il existe un certain nombre de ferments qu'on appelle improprement ferments réducteurs, quoiqu'ils ne désoxydent pas les corps en présence. Ils possèdent la propriété commune de dégager de l'hydrogène en mélange d'ailleurs avec d'autres gaz.

Le type de ces ferments est celui de la fermentation butyrique qui théoriquement est représentée par l'équation :

$$C^6H^{12}O^6 = C^4H^8O^2 + 2CO^2 + 2H^2.$$

Mais il y a d'autres ferments réellement réducteurs qui enlèvent de l'oxygène.

Ferments déshydrogènants. — 1) Ferment Pasteur. — La fermentation butyrique a été mise en évidence par Pasteur dans une expérience déjà citée. Pour la rendre plus précise il lui a donné la forme suivante :

Il prend un ballon à col de cygne et le remplit complètement d'un bouillon constitué par un mélange de lactate de chaux et de sels nutritifs. On fait plonger le

col dans une capsule pleine du même liquide et l'on porte le tout à l'ébullition. On laisse ensuite refroidir le ballon tout en continuant à faire bouillir le liquide de la capsule. Le ballon en se refroidissant continue à se remplir d'un liquide stérilisé.

Cela fait, par la tubulure latérale, on ensemence le bouillon avec du vieux fromage. Comme il n'y a plus de trace d'air, le ferment lactique ne peut se développer. Une fermentation butyrique se développe alors.

Les ferments que Pasteur a ainsi cultivés sont des bacilles mobiles qu'il avait pris pour des vibrions. Ces bacilles sont généralement réunis par deux ou trois et chacun des bacilles marchant, en glissant, pour son compte personnel, la rigidité du système n'est pas absolue, d'où l'apparence de mouvements de torsion, rappelant ceux des vibrions.

La température la plus favorable à leur développement est de 25 à 30°, ils ont la propriété de sporuler au centre.

Ils font fermenter les sucres, l'amidon, les acides-alcools, tels que l'acide lactique, l'acide tartrique, le lactate de chaux.

Il faut remarquer que la réaction représentée par la formule citée plus haut est loin d'être réalisée totalement. Le rapport $\frac{CO^2}{H^2}$ diffère de $\frac{44}{2}$. Il doit donc se produire d'autres réactions et nous allons nous faire une idée de la nature de ces variations par l'étude d'autres espèces.

Ce premier ferment se trouve être le plus mal décrit. Cela se comprend puisqu'il est le plus ancien et puisque le nom de son auteur a sans doute un peu effrayé les chercheurs.

Il est probablement un mélange des ferments suivants.

Comme autres ferments butyriques nous citerons :

2) Bacille amylobacter de Trécul. — Il est ordinairement mélangé au précédent; il présente cependant une différence avec le premier.

Les spores se forment en tête et non au centre et ce qui est important au moment où elles se forment, si l'on traite le bacille par l'eau iodée, on aperçoit certains points qui se colorent en bleu. Il contient donc une substance qui se rapproche de l'amidon, de là le nom d'amylobacter. Enfin la spore végète latéralement.

Au point de vue chimique, ce bacille fait fermenter le sucre, l'amidon, de plus il fait fermenter directement la cellulose. C'est un des microbes qui interviennent dans le rouissage du lin.

3) Clostridium butyricum de Prasmoski. — Un troisième ferment est le *Clostridium butyricum de Prasmoski*, mêlé aux précédents (fig. 76).

La spore végète en tête et non latéralement comme pour le précédent.

Ces trois microbes donnent surtout de l'acide butyrique. Ils sont essentiellement anaérobies.

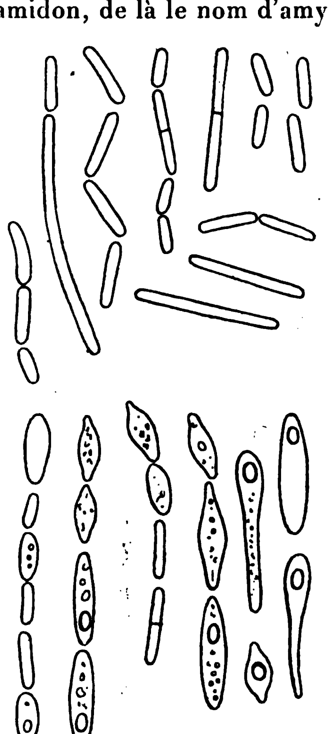


Fig. 77. — Clostridium butyricum de Prasmoski.
D'après Jorgensen.

Nous allons maintenant étudier un second groupe de ferments appelés ferments butyriques, mais chez lesquels la production de

corps autres que l'acide butyrique sans devenir prépondérante devient importante.

Nous citerons d'abord des ferments butyriques donnant en même temps d'autres acides.

4) Bacille d'Omeliansky. — C'est un bâtonnet de 4μ-8μ de longueur qui se développe sur la pâte à papier de Suède à l'abri de l'air et en présence de peptone et de sels de chaux. Il vit de cellulose et donne des acides butyrique et acétique. Il n'agit pas sur les sucres et l'amidon. Les spores résistent 25′ à 90°, mais sont tuées à 100°. A la sporulation, le bacille est colorable en bleu par l'eau iodée.

5) Bacille de l'amertume des vins. — Un autre microbe est le bacille qui provoque la maladie des vins appelée l'amertume. Il se développe surtout sur les vieux vins de Bourgogne. Il est légèrement coloré en rouge et est cilié.

Sa spore est terminale et la température la plus favorable à son développement est comprise entre 25° à 37°. Il se cultive dans l'eau de levure glucosée légèrement alcaline. Par fermentation il donne des acides butyrique, acétique et lactique. Cultivé dans la glycérine, on ne retrouve pas trace d'acide butyrique, mais seulement de l'acide lactique. Ce qui est un exemple du peu de valeur de notre classification, car d'après cela on pourrait considérer ce microbe comme un ferment lactique.

6) Bacilles de la pousse des vins. — Nous citerons ici les ferments butyriques causant la maladie des vins appelée la pousse ou la tourne. Le vin devient fade, à odeur butyreuse et se trouble. En agitant le vin on constate des ondes soyeuses qui se déplacent. Il y a dégagement de gaz carbonique et dépôt d'une lie blanchâtre qui contient le microbe. Cette maladie se développe surtout par la chaleur dans les vins peu alcooliques, peu acides et sucrés.

En réalité, la maladie est due à deux microbes. Le premier est le *bacille roseosus*. Quand on le cultive dans l'eau de levure glucosée on produit à la surface un voile épais, plissé et rose. Il est formé de bacilles un peu ovoïdes et ciliés, très mobiles et réunis en chaînes.

Le bouillon dans lequel on fait la culture devient ammoniacal et il se produit en même temps des acides butyrique, acétique et lactique.

Cultivé dans la glycérine il ne donne ni acide butyrique, ni acide lactique. Il se produit l'acétone dérivant de la glycérine :

$$CH^2OH — CO — CH^2OH.$$

Si, dans la culture, on ajoute de l'acide tartrique à dose élevée, le développement n'a pas lieu.

Le deuxième microbe ressemble au premier. Il en diffère cependant en ce qu'il détruit l'acide tartrique tandis que le premier n'y touche pas.

Il existe enfin une troisième catégorie de ferments butyriques. Ceux-là donnent une proportion importante des alcools correspondants aux acides produits.

7) Bacille butylicus de Fitz. — Le premier de ces ferments est le *bacille butylicus de Fitz*. Il a été trouvé dans une infusion de foin. C'est un bâtonnet elliptique à mouvements rapides qui sporule en tête et qui ne fait fermenter ni l'amidon, ni les acides-alcools ; mais il fait fermenter le sucre, la glucose, la mannite et la glycérine.

Il donne comme produits de la fermentation de l'hydrogène, de l'acide carbonique, des acides lactique, succinique, butyrique (surtout avec les sucres), de l'alcool butylique (surtout avec la glycérine et la mannite), un peu d'alcool ordinaire (surtout avec de la glycérine).

La fermentation s'arrête à 8 pour 100 d'alcool ou d'acide formés.

8) Bacille de Bayerinck. — A côté de ce ferment il y a des espèces nombreuses. Bayerinck a découvert un bacille presque semblable au précédent. Il s'en distingue cependant parce qu'il ne donne presque exclusivement avec la glycérine que de l'alcool ordinaire.

9) Bacille orthobutylicus de Grimbert. — Un autre ferment est le *bacille orthobutylicus de Grimbert.* Il a été trouvé dans une infusion de haricots. Il se cultive bien à 35°, il donne 2 à 3 spores qui résistent à la température de 80° pendant 16′; elles sont tuées à 85°. Il fait fermenter la glucose, la galactose, l'arabinose. De plus il fait fermenter sans inversion apparente la saccharose (1), la maltose, la lactose, l'inuline, etc. L'inversion a sans doute lieu mais elle n'a pu probablement être observée parce que la fermentation se produit au fur et à mesure du dédoublement. Par fermentation de ces produits, on obtient de l'hydrogène, de l'acide carbonique, des acides butyrique, acétique et de l'alcool butylique.

Au début, l'hydrogène se dégage en plus grande quantité qu'à la fin, ce qui veut dire qu'à la fin de l'opération la production d'alcool est plus grande qu'au commencement.

Ce bacille orthobutylicus n'agit pas sur la cellulose, et comme il ne bleuit pas l'iode à la sporulation, il est très nettement distingué de l'amylobacter de Trécul.

Ce microbe fait fermenter l'amidon. Mais ici il y a inversion et Grimbert admet deux diastases.

Voici son expérience : Prenons un bouillon de culture et arrêtons le développement du microbe par un antiseptique (essence de moutarde). Ce bouillon paraît invertir l'amidon en dextrine et la dextrine en maltose.

---

(1) Cette non inversion de la saccharose, jointe au fait de fermenter l'amidon, distingne l'orthobulycus du microbe de Fitz.

Prenons le même bouillon. Faisons-le bouillir, puis laissons-le agir. Dans ce cas il y a bien encore production de dextrine, mais la maltose n'apparaît pas. Il semble donc qu'il existe deux diastases, l'une résistante à l'ébullition et agissant sur l'amidon pour donner de la dextrine, et l'autre coagulée par l'ébullition et agissant sur la dextrine pour donner de la maltose.

Grimbert a constaté que quand on change le milieu de culture, les résultats obtenus diffèrent. Ainsi, il a constaté que pour une culture sur pomme de terre le rapport $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide butyrique}} = \frac{1}{5}$ et que pour une culture sur sucre le rapport est $\frac{2}{5}$.

Enfin l'auteur a fait une expérience curieuse. Prenons le microbe et essayons de le cultiver dans un bouillon d'inuline. Le microbe se développe assez mal et donne peu d'alcool butylique. Prenons une goutte de la culture sur inuline et ensemençons avec cette goutte un bouillon de glucose. Le microbe se développe immédiatement et avec énergie en donnant beaucoup d'alcool butylique. Faisons six cultures successives sur glucose, la sixième devient aussi pénible que celle du début sur inuline.

Prenons une goutte de cette culture sur glucose et ensemençons un milieu d'inuline. Le microbe végète très facilement et activement. Faisons des ensemencements successifs, à la cinquième ou sixième culture il revient à l'état du début. Ceci s'applique également à tout microbe placé comme celui dont nous parlons dans l'alternative de choisir entre deux milieux qui ne lui conviennent pas complètement; à chaque changement de milieu le microbe reprend un peu puis s'étiole à nouveau.

Grimbert a montré à l'aide de ce microbe d'autres influences d'ordre général.

1° Si le milieu de culture est neutre, le rapport $\frac{\text{acide butyrique}}{\text{acide acétique}}$ augmente. Au contraire, si le milieu est acide.

Et si un milieu neutre ne contient pas de carbonate de chaux capable de neutraliser les acides produits, le rapport d'abord croissant tend à diminuer;

2° Lorsque la durée se prolonge, les acides décroissent tandis que l'alcool butylique tend à croître ;

3° Si on ensemence avec une culture jeune, on a prédominance d'alcool et inversement.

10) Bacille amylozyme de Perdrix. — Il est plus petit que le précédent. La température la plus favorable à son développement est 35°. Il est le plus anaérobie de tous les ferments étudiés, car il peut être cultivé dans l'hydrogène, l'azote, l'acide carbonique, et dans le vide. Il n'agit ni sur la cellulose, ni sur les acides-alcools, mais il agit sur l'amidon et les sucres. Il paraît faire fermenter les sucres sans inversion ; il donne, au début de la réaction, des acides acétique et butyrique, tandis qu'à la fin il ne donne plus que de l'acide butyrique.

Mais si on le fait fermenter sur l'amidon on trouve une série de produits inattendus.

On trouve de l'alcool ordinaire et de l'alcool amylique. De plus, si on analyse le bouillon restant et si ce bouillon est légèrement acide, on trouve un sucre formé par décomposition de l'amidon. Si le bouillon est neutre on ne retrouve pas ce sucre, qui fermente et disparaît sous l'influence du microbe en milieu neutre.

11) Bacille amylobacter butylicus. — On l'extrait de la terre végétale. Il supporte la vie aérobie ce qui le distingue des autres. Il a des spores centrales, il se colore par l'iode. Il fait fermenter l'amidon surtout en vie anaérobie.

Dans ce cas on obtient non seulement des acides acé-

tique, butyrique, lactique, mais encore de l'alcool ordinaire, de l'alcool butylique et de l'aldéhyde.

Ici encore on constate que le milieu a une influence sur les produits de la fermentation.

Prenons un milieu composé de touraillon et d'empois. Si le milieu est acide on trouve que les rapports $\frac{\text{alcool produit}}{\text{amidon disparu}}$ et $\frac{\text{acides volatils}}{\text{amidon disparu}}$ sont plus petits qu'ils ne le seraient dans le même milieu où on aurait ajouté de la craie de façon à neutraliser les acides au fur et à mesure de leur production.

Il fait fermenter la glycérine. Dans ce cas il se forme de l'acide butyrique et de l'alcool butylique sans dégagement d'hydrogène et de gaz carbonique. Il fait fermenter la mannite, le lactate de chaux, les albuminoïdes avec production d'ammoniaque, l'acide succinique, sans production d'alcools.

12) Bacille ethacéticus de Franckland. — Il ressemble au bacille de Fitz. Mais tandis que la bacille de Fitz donne avec de la glycérine, surtout de l'alcool butylique, celui-ci donne surtout de l'alcool ordinaire à la température moyenne de 40°. Il ne fait pas fermenter la mannite.

13) Bacille amylobacter éthylicus. — Il ressemble à l'amylobacter butylicus, mais sur l'amidon il donne des acides acétique, butyrique, de l'alcool ordinaire et de l'aldéhyde. Il ne sporule pas.

14) Bacille viscosus Bruxellensis de Van Lœr. — Découvert dans des lambics à double face, il constitue des bâtonnets de 1,7 à 0,7 μ. Développé dans la bière il la rend d'abord visqueuse, puis la viscosité disparaît; cette viscosité est due à la présence d'une capsule entourée d'une gaine gélatineuse et qui tend à disparaître. Cette propriété disparaît en culture aérée. Elle n'a pas lieu dans de l'eau de levure glucosée et au contraire se produit si

on ajoute de la peptone ou de l'asparagine qui font renaître la viscosité dans une bière redevenue limpide. De même agit une culture de mycoderma. La capsule est surtout azotée, la gaine surtout gommeuse.

Ce bacille attaque la glucose, la saccharose, la maltose, la lactose en donnant des acides butyrique et lactique. La saccharose n'est pas invertie.

Ferments véritablement réducteurs. — FERMENTS DÉNITRIFIANTS DU SOL. — En 1873, Schlœsing remplit un flacon de terre arable et le ferma.

Il constata au bout d'un certain temps que l'azote des nitrates avait diminué. On a découvert depuis que ce phénomène devait être attribué à des microbes, les uns aérobies et les autres anaérobies possédant la propriété de décomposer les nitrates, les uns en donnant des nitrites, les autres du protoxyde d'azote et même de l'azote.

Le microbe le plus connu est la bactérie mycoïde. C'est en définitive une bactérie grosse, épaisse, qui cultivée sur gélatine donne de nombreuses ramifications et qui joue un rôle dans les putréfactions en milieu aérobie (comme le B. termo). Dans le sol elle aide à la putréfaction des matières organiques et à la formation d'ammoniaque oxydée ensuite par le ferment nitrique. Cette même bactérie peut agir sur les nitrates pour les réduire.

Il en résulte que ce microbe dégage l'azote des matières albuminoïdes par un processus compliqué. Il aide d'abord à former de l'ammoniaque, puis quand celle-ci est oxydée par les ferments nitreux et nitrique, il réduit les nitrates.

Ces ferments dénitrifiants sont de véritables réducteurs.

Ce serait entrer dans le domaine agricole médical que de pousser plus loin cette étude. Cependant à titre de renseignements disons que le B. coli et le B. d'Eberth donnent aussi de l'azote aux dépens des nitrates.

Bacilles de l'acide tartrique. — Pour être complet disons qu'il existe des bactéries qui vivent aux dépens de l'acide tartrique ; elles donnent des acides acétique et succinique et quelquefois de l'alcool.

La formation d'acide succinique $C^4H^6O^4$ aux dépens de l'acide tartrique $C^4H^6O^6$ est une perte d'oxygène, de même la formation d'alcool C^2H^6O est une perte d'oxygène et d'acide carbonique.

Ces microbes semblent donc rentrer dans la dernière catégorie étudiée.

Mais la formation d'acide acétique $C^2H^4O^2$ aux dépens de l'acide tartrique $C^4H^6O^6$ est une perte d'acide carbonique et d'hydrogène, de sorte que le rôle de ces microbes est mixte, il tient de celui des ferments butyriques et des ferments dénitrifiants.

Grimbert en a décrit un qui ne donne pas d'alcool aux dépens de l'acide tartrique mais qui réduit les nitrates en nitrites, et qui attaque la glucose, la lactose, la maltose, la saccharose, la dextrine, la mannite, sans attaquer la glycérine et la dulcite.

Fermentations par dédoublement. — Ferments lactiques. — Ferment Pasteur. — Le type de ces fermentations est la fermentation lactique qui peut se définir par l'équation suivante :

$$C^6H^{12}O^6 = 2(CH^3 - CHOH - CO^2H)$$

La fabrication de l'acide lactique était connue dès 1780 ; Scheele mettait du vieux fromage dans du petit lait en présence de craie, il recueillait du lactate de chaux qu'il décomposait.

En 1857, Pasteur a reconnu que cette transformation de la lactose en acide lactique était due à un microbe.

C'est un bâtonnet mobile étranglé au milieu, très petit (3 μ sur 1,5 μ). Il se rencontre isolé ou en chaîne de 2 ou 3 éléments. Il se cultive surtout bien à 44°, il

peut résister à 70° et est tué à 100°, il est essentiellement aérobie (fig. 78).

Son alimentation est identique à celle de la levure, mais il est plus vorace que celle-ci.

Comme aliment azoté, c'est la caséine du lait qui est son aliment préféré, mais il se développe très bien dans la peptone, le jus d'oignon, l'urine, etc.

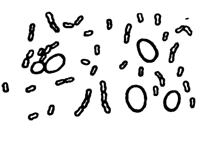


Fig. 78. — Bactérie lactique.

Il fait fermenter différents sucres, entre autre la lactose.

Le ferment lactique ne paraît pas invertir la saccharose ni la maltose, il fait fermenter la mannite avec dégagement d'hydrogène ; il agit sur le malate de chaux.

Cultivé sans précaution il se développe jusqu'à une acidité de 15 grammes par litre.

Telle est la description que Pasteur a donnée de ce microbe.

Elle est sans doute inexacte, car on a pu obtenir par cultures sélectionnées des races différentes et ce que Pasteur a étudié n'est probablement qu'un mélange de divers microbes.

Autres ferments lactiques. — Hueppe a décrit une bactérie produisant la fermentation de différents sucres et entre autre de la lactose, avec production d'acide lactique et de gaz carbonique. Cette bactérie est formée de bâtonnets courts, immobiles, accolés par 2 ou par 4. Elles sporulent dans les solutions sucrées. Elles sont absolument aérobies. Elles font coaguler la levure du lait.

Dans la levure de boulangerie, Peter aurait mis en évidence un ferment lactique qui sur gélatine donne des bâtonnets essentiellement mobiles. Tandis que sur eau de levure glucosée, ils s'arrêtent et s'allongent en filaments.

Van Laer a décrit sous le nóm de Saccharobacillus pastorianus des filaments qu'on trouve dans la bière tournée.

C'est un microbe qui n'a pas de préférence pour l'oxygène et qui fermente la saccharose sans inversion en donnant de l'alcool, de l'acide acétique et de l'acide lactique. Ces acides précipitent les matières albuminoïdes qui donnent lieu aux nuages soyeux qui se forment par agitation de la bière.

Lindner a décrit sous le nom de pediococcus acidi lactici un micrococcus réuni par 4 et qui se développe surtout bien à 41° sur l'extrait de malt neutre. Il fournit alors une forte réaction lactique ; il est tué en portant la culture à 60°.

En appliquant les méthodes de Hansen, certains auteurs ont sélectionné différents ferments lactiques.

Ainsi Storch a isolé un ferment qui donne au beurre un arôme spécial; il est formé de cellules courtes, ovales, réunies en chaînes mobiles.

De même Qvist a isolé un micrococcus analogue.

D'autres auteurs ont tiré des laits visqueux ou amers différentes bactéries dont quelques-unes donnent de l'acide lactique (1). Leichmann a également isolé du lait un coccus.

Travail de Kayser et Gentil. — Kayser et Gentil ont décrit quinze races caractérisées par l'influense de l'air (il en est d'aérobies et d'anaérobies), par l'apparence des cultures, la forme, la résistance à la chaleur, à l'acidité, par le temps nécessaire pour coaguler le lait. En faisant attentivement l'étude de ces ferments lactiques, par les procédés actuels, Kayser a trouvé qu'ils forment non seulement de l'acide lactique et de l'acide acétique, mais encore de l'alcool ordinaire, de l'acide formique, de

---

(1) A côté de ces sortes de ferments lactiques, dans le lait visqueux il peut y avoir des bactéries qui dissolvent la caséine ; d'autres qui saponifient le beurre ; d'autres qui rendent simplement visqueux le lait.

l'acétone, etc... Les proportions de ces corps dépendent des races et des procédés de culture. Ces ferments lactiques font fermenter un grand nombre de sucres, entre autres la dulcite, l'inosite, les pentoses.

Il y en a qui détruisent jusqu'à 95 pour 100 du sucre; lorsque la solution sucrée est à 2,3 pour 100 l'action est très rapide. Ils agissent sur la dextrine mais mieux en présence de la glucose ou de la maltose.

Les jeunes ferments sont moins actifs que les vieux.

Ils peuvent donner de l'acide lactique aux dépens d'une matière azotée pure.

La température optimum varie suivant les espèces entre 30° et 40°.

Ils sont très avides d'azote surtout celui des peptones.

Les ferments cultivés en surface sont plus riches en azote que ceux cultivés en profondeur.

Il ne paraît pas y avoir de zymase lactique.

Au point de vue de la formation d'acide, les auteurs ont trouvé que pour un même ferment, la dose d'acidité dépend du milieu et que pour un même milieu elle dépend de l'espèce du ferment, et qu'un mélange ne produit pas l'effet moyen des effets des espèces isolées.

En milieu neutre il se forme plus d'acide lactique; en culture sur peptone il en est de même; mais alors il y a moins d'acides volatils : les ferments lactiques s'arrêtent pour une dose limite d'acide de 10 à 17 grammes par litre suivant la nature des moûts et les espèces de ferments.

Au point de vue du mélange avec les levures, on peut citer les faits suivants :

Une dose de 0,8-1,6 pour 100 d'acide lactique suivant les espèces de levures n'est pas nuisible ; mais 2 pour 100 est nuisible à beaucoup d'espèces, de sorte que les levures sont gênées si le ferment lactique agit trop longtemps ; d'ailleurs les levures supportent mieux l'acide

lactique produit ainsi graduellement qu'une addition massive de la dose finale.

Dans ces fermentations en milieu lactique il se produit la même quantité d'alcool que dans un milieu ayant une acidité sulfurique équivalente ; mais il y a dans le premier cas plus d'acides volatils.

Dans ces fermentations de levures en milieu lactique les ferments lactiques supportent moins d'acidité qu'en cultures indemnes de levure, et la levure donne moins d'alcool que si elle était seule.

Cependant si on opère en milieu non stérile, la levure donne moins d'alcool qu'en présence de 1 pour 100 d'acide lactique qui la protège contre les contaminations.

Ferments des levains lactiques. — La *bactérie Delbruckii* a été sélectionnée des levains lactiques de distillerie. En l'isolant sur plaque de gélose, puis en la cultivant dans un moût à 40° on obtient des chaînes assez longues de bâtonnets peu visibles et ne supportant pas une acidité supérieure à celle de 5 grammes d'acide sulfurique par litre.

Ils ne se développent qu'en milieu légèrement acide et exigent des albuminoïdes proprement dits. Les peptones et les albuminoïdes coagulés sont insuffisants.

Ce ferment lactique agit sur la glucose et la maltose, il donne des acides lactique, formique, valérianique, de l'alcool ordinaire, de la mannite et peut-être de la sorbite. Les acides formique et valérianique sont en proportions équivalentes.

Autres ferments lactiques. — On a reconnu que beaucoup de ferments pathogènes étaient des ferments lactiques. Tels sont, le microbe de la fièvre typhoïde, le bacille coli, le diplocoque de la pneumonie, la staphylocoque doré de l'ostéomyélite, etc. (1).

---

(1) On a observé sur les microbes pathogènes l'influence du milieu ;

Le micrococcus prodigiosus joue également le rôle de ferment lactique (1).

Un autre ferment intéressant est le *bacille Boocropicus,* provenant de la bouse de vache. On le cultive en milieu glycériné. Il se présente sous forme de bâtonnets arrondis groupés par deux. Les spores sont centrales.

Ainsi cultivé on obtient des acides acétique, butyrique, succinique ; il ne donne pas d'acide lactique, mais de l'alcool méthylique. A l'air l'action est nulle.

Cultivé sur de la glucose, il donne de l'acide lactique et de l'alcool ordinaire avec des traces d'acide succinique ; avec la lactose, on a au contraire beaucoup de cet acide.

Remarque. — On peut faire cailler le lait par la présure en présence de chaux. Dans ce cas le lait n'a pas besoin de contenir de lactose.

On sait de plus que le lait même en présence d'un antiseptique peut cailler naturellement grâce à un ferment soluble qu'il contient. Ces deux phénomènes sont différents de celui produit par le développement dans le

---

ainsi un bacille typhique du rat et le bacille coli de l'homme cultivés sur glucose donnent en présence d'ammoniaque ou de peptone de l'acide lactique gauche ; tandis qu'un bacille coli du cheval qui donne ce même acide en présence de l'ammoniaque, donne de l'acide droit en présence de la peptone. Dans ces derniers temps on a montré que la bactérie charbonneuse virulente a surtout des propriétés protéolytiques et qu'atténuée elle prend des propriétés amylolytiques. Cultivée sur amidon, elle donne de l'acide lactique qui tend à se transformer en acide acétique ; demeure une culture en milieu pauvre en saccharose. Mais sur milieu riche en sucre donne un mélange des deux acides.

(1) Le micrococcus prodigiosus est un coccus rouge immobile réuni en amas de plus de 10 cellules et dont la couleur s'exagère par ensemencement successif de cellules jeunes sur pomme de terre.

En ensemençant des cellules vieilles, on peut faire perdre la teinte rouge. De même en chauffant 5′ à 50° une culture sur bouillon de veau.

Une culture sur bouillon de veau acidulé de 0,5 d'acide tartrique par litre donne une forme en bâtonnets mobiles entourés d'une gelée.

lait d'un ferment lactique aux dépens de la lactose. Ici l'acide lactique produit la coagulation.

Bactériacées à fonctions mal définies. — Pediococcus et sarcines. — On appelle pediococcus des coccus réunis par 4 et sarcine des coccus réunis par 8.

Nous avons déjà cité le P. acidi lactici de Lindner. Le même auteur en a décrit beaucoup d'autres.

En outre une espèce rendrait filante la bière blanche de Berlin mais serait sans action sur le moût houblonné ou la bière basse.

Lindner a encore décrit le P. cerevisæ qui donne une légère acidification lactique, et qui, cultivé sur gélatine, donne des colonies qui avec le temps deviennent jaunâtres ou brunes, sans liquéfier la gélatine.

Quant aux sarcines, on en trouve également dans les moûts de bière et de distillerie. On ne sait presque rien sur elles.

Il en existe un grand nombre : quelques espèces particulières à la brasserie ont été un peu mieux étudiées et quelques-unes paraissent provenir du fumier.

La température la plus favorable à leur développement est de 17° à 20°. En distillerie on en trouve dans les drêches des moûts amylacés. On a prétendu que quelques-unes de ces sarcines possèdent des propriétés pathogènes, ce qui rendrait nuisible l'emploi de ces drèches pour la nourriture des bestiaux.

Microbes fixateurs de l'azote. — Il existe un grand nombre de microbes fixant l'azote. Au moment d'une récolte de plantes, on enlève au sol certains éléments. Si l'on calcule la perte de matières minérales subie par le sol on trouve qu'elle correspond à la quantité d'éléments retrouvés dans la récolte.

Parmi les éléments enlevés au sol il y a de l'azote ; il semblerait donc que le terrain dût s'appauvrir en azote comme en matières minérales. Le sol est souvent au

contraire plus riche en azote après la récolte qu'avant l'ensemencement. Il faut donc qu'il y ait une fixation d'azote supérieure au prélèvement de la récolte.

On a essayé de donner une explication de ce fait en admettant que la terre agit comme un corps poreux à la faveur duquel l'azote et l'oxygène se combineraient en donnant de l'acide nitrique. Mais l'expérience prouve le contraire.

On a également essayé de donner l'explication suivante. Par suite des combustions lentes, il se forme de l'ozone et par conséquent de l'azotite d'ammoniaque.

Mais si cette explication est plausible elle ne peut rendre compte de la grande quantité d'azote fixée.

Berthelot prend une terre nue et l'abandonne en présence d'humidité à une température de 0° à 40°. Il constate la fixation de l'azote surtout si la terre n'est pas trop acide et est bien aérée.

Si au lieu de terre nue on prend une terre couverte de plantes, il y a encore fixation d'azote mais en général en moins grande proportion que par la terre nue; mais prend-on une terre couverte de légumineuses (par exemple de lupin bleu) il y a alors une fixation d'azote plus grande que dans le cas de la terre nue. Si on regarde les racines d'une légumineuse on aperçoit des nodosités. Or ces nodosités contiennent des bactéries, la fixation de l'azote est due à ces bactéries. On a reconnu depuis, qu'une terre couverte non seulement de légumineuses, mais encore de certaines algues présentait les mêmes phénomènes dus encore à des bactéries. La bactérie en se fixant sur la plante devient, au point de vue des hydrates de carbone et de l'azote, un parasite de cette plante. Elle en suce les matières hydrocarbonées et azotées pour végéter à ses dépens. Pendant sa végétation elle fixe l'azote de l'air probablement sous forme d'ammoniaque et elle élimine certaines matières azotées qui profitent à la plante. Quoi

qu'il en soit, on ne connaît pas le mécanisme de l'absorption de l'azote de l'air par les bactéries des nodules.

Symbiose.

Le phénomène de vie en association a reçu le nom de *symbiose.* Il se rencontre souvent en distillerie.

Képhir. — Dans le Caucase on fait une boisson fermentée, appelée képhir, en mettant sur du lait de vache des grains mamelonnés et gélatineux d'une semence spéciale, employée soit à l'état frais soit à l'état sec après ramollissement par un séjour de plusieurs heures dans l'eau tiède et par un réveil dans du lait frais qu'on renouvelle toutes les 8 ou 10 heures.

L'opération se conduit ainsi : dans le lait on verse la semence et on abandonne à 15-18° pendant 20 heures en agitant toutes les heures. On filtre alors dans un linge pour retirer la semence qui servira pour une nouvelle opération. Quant au liquide il est mis en bouteilles bouchées, on l'agite de temps en temps et on le boit après 1, 2, 3 jours. Il présente alors l'aspect de lait ayant crémé, c'est-à-dire qu'une couche caséeuse surnage au-dessus d'une sorte de petit lait. On l'émulsionne avant de le consommer.

La semence est formée d'une levure ronde ou ovale à articles souvent réunis; elle est englobée dans les zooglées de différentes bactéries dont la plus importante est la dispora caucasia, bactérie courte, mais formant souvent de longues chaînes; elle a des spores sphériques qui se produisent surtout pendant la période de sécheresse des grains de képhir, ou par une culture sur eau sucrée à 20-21°. A côté de cette dispora se trouvent sans doute des ferments lactique et butyrique.

On a cru longtemps que la levure contenue dans le képhir était incapable de dédoubler la lactose, Fischer a montré le contraire. Cependant les cultures séparées de

la levure et des bactéries réunies ensuite en mélange ne constituent pas du képhir.

Il est probable que l'acide lactique produit par les bactéries intervient dans l'inversion du sucre, en tout cas il tend à coaguler la caséine. Or le képhir contient moins de caséine que le lait caillé, une partie de cette caséine est nécessairement peptonisée. C'est sans doute le rôle de la dispora. D'autre part on ne retrouve pas de peptone, donc la levure la consomme.

Dans tout ceci, il y a intervention des bactéries au profit de la levure; celle-ci intervient sans doute au profit des bactéries par la protection due à l'alcool car il s'en forme jusqu'à 2 pour 100. Il est vrai qu'on en retrouve à peine la moitié à cause des agitations du liquide.

On voit donc que la fabrication du képhir est un phénomène de symbiose.

Matzun. — On boit en Arménie une boisson appelée matzun. Cette boisson est également faite avec du lait de vache et une semence. Elle a été étudiée dernièrement. On a trouvé des levures et un coccus aérobie qui coagule le lait en donnant de l'acide lactique aux dépens de la lactose ou de la saccharose. Ce ferment se développe bien entre 25°-30°. On a aussi trouvé dans la semence un ferment lactique sous forme de bacille qui donne de l'acide lactique ayant un pouvoir rotatoire dextrogyre tandis que le coccus donne un acide lactique inactif.

Enfin on a trouvé également l'oïdium lactis, un grand bacille, etc. Mais ces microbes ne paraissent pas jouer un rôle actif dans la fermentation du matzun.

Koumyss. — Un troisième cas de symbiose est celui du koumyss consommé en Tartarie et fabriqué avec du lait de jument. On ensemence avec du vieux lait du lait frais. La boisson obtenue contient de l'alcool et de l'acide lactique, il reste toujours du sucre et le produit n'est plus coagulable. On a isolé une levure capable d'invertir

directement la lactose et la saccharose. Cette levure est associée à des bactéries.

Bière de gingembre. — On introduit dans une solution sucrée additionnée de gingembre une semence ayant un aspect analogue à celle du képhir. Il y a fermentation alcoolique et le moût devient visqueux.

Parmi les organismes isolés de la semence s'en trouvent deux essentiels :

L'un est le saccharomyces piriformis qui invertit le sucre et le fait fermenter activement. Il sporule à 25° en 40 ou 50 heures sur bloc de plâtre. Sur moût de bière il forme un voile dont les cellules ont la forme de poire.

A côté de cette levure se trouve une bactérie, le bacterium vermiformis qui provient sans doute du gingembre, sorte de long filament entouré ordinairement d'une gaine gélatineuse qui enrobe les levures. Ces gaines disparaissent en milieu aéré et non acide.

Ces 2 micro-organismes cultivés en symbiose redonnent la bière de gingembre.

A côté d'eux se trouvent des mycodermes, du bacterium aceti, etc.

Autre exemple de symbiose. — Le microbe amylozyme peut donner, cultivé sur l'amidon, de l'alcool amylique. Cultivé en mélange avec de la levure, on obtient un mélange d'alcool et d'alcool amylique.

Si on ensemence de la levure dans une culture d'amylozyme même stérilisée le résultat obtenu est le même que celui de la culture en mélange.

Mais si on ensemence l'amylozyme dans une culture stérilisée de levure, on n'a rien de comparable.

Donc l'amylozyme a besoin de la présence de la levure pour végéter dans les conditions décrites, il ne lui suffit pas du milieu créé par la levure puisqu'une culture stérilisée de levure est insuffisante.

Maladie de la graisse. — Une maladie (1), la graisse des vins, semble être un phénomène du même genre.

Les vins graisseux deviennent fades et filants ; ils contiennent une gomme et de la mannite.

Pasteur, qui a étudié le premier cette maladie, a découvert dans les vins graisseux un coccus et un microbe plus gros.

Quand on cultive le mélange de ces deux microbes sur la glucose, elle se transforme pour 45 pour 100 en une sorte de gomme et pour 51 pour 100 en mannite. Le reste est formé d'acide carbonique. La gomme paraît dériver plus ou moins de la galactose car, traitée par l'acide nitrique, elle donne de l'acide mucique. Elle a pour formule $C^6H^{10}O^5$. Pour passer de la glucose $C^6H^{12}O^6$ à cette gomme, la glucose a dû perdre par dédoublement une molécule d'eau. Quant à la mannite $C^6H^{14}O^6$, elle ne peut se former que par hydrogénation.

Nous avons donc là une fermentation qui ne rentrerait pas dans le cadre des fermentations précédentes, si on admettait que les 2 microbes ont tous les deux les deux propriétés de fournir la gomme et la mannite ; mais il est probable que celle-ci est due au coccus.

On a repris cette étude. On a isolé un microbe à bâtonnets étranglés au milieu, d'où l'aspect de chaînes de coccus. Cultivé en milieu acide, il transforme la glucose en mannite et donne en même temps des acides acétique, lactique et peut-être butyrique et propionique.

---

(1) *Remarque* : Nous avons parlé de 6 maladies des vins : 1° la casse due à l'oxydase du Botrytis cynerea ; 2° la fleur due au voile du M. vini qui brûle l'alcool et rend le vin plat ; 3° l'acescence ou piqûre due au B. acétique, qui acidifie l'alcool ; 4° l'amertume due à une sorte de ferment butyrique ; 5° la tourne due à l'association de 2 ferments voisins du précédent et 6° la graisse due au développement du ou des ferments mannitiques.

Après 7 ou 8 jours de culture il donne un voile. Si l'on cultive les cellules de ce voile, elles donnent de l'alcool ordinaire et de l'acide acétique. Mais si on recouvre la culture d'un peu de vaseline ou si on ajoute de la levure pour dégager du gaz carbonique, c'est-à-dire si l'on place la culture à l'abri de l'air, celle-ci retourne à l'état primitif et la fermentation reprend ses caractères de fermentation mannitique.

Dans ces derniers temps, Meissner a rappelé que le dematium pullulans peut rendre filant le moût de raisin, il a de plus trouvé des levures ascopores, plus petites que les levures de vin qui paraissent produire la graisse. Ces levures, au nombre de 7, craignent une dose d'alcool variant de 5 à 9 pour 100. A part deux, elle ont besoin d'air; les deux autres étant d'ailleurs peu actives. Cette basse limite de l'alcool montre que l'on peut empêcher la graisse produite par ces levures, en ensemençant fortement le moût avec une levure énergique.

Remarque sur la fermentation panaire. — On a souvent considéré cette fermentation comme les résultats d'une symbiose. Il est probable qu'il n'en est rien.

Dans la fabrication du pain, pendant le pétrissage, on incorpore à la farine de l'eau salée et le levain. Puis on abandonne environ 30 minutes à une fermentation qui constitue l'apprêt. On coupe le pâton en miches qu'on saupoudre de farine et qu'on cuit après 30 minutes de repos dans un four ayant 275° en moyenne.

Ce levain qui n'est qu'un fragment d'une opération précédente comprend différents organismes, entre autres la saccharomyces minor. Dumas lui attribuait le rôle unique dans l'opération. Le pétrissage développerait la saccharification de la farine, ce qui n'est pas impossible, car la farine contient une partie des diastases des grains. L'apprêt dégagerait du gaz carbonique que la chaleur dilaterait au four. D'ailleurs pendant la cuisson, l'intérieur

du pain est lent à s'échauffer, l'action diastasique et l'action fermentative continuent.

On a objecté à cette manière de voir que d'abord on ne retrouve pas d'alcool dans le pain et qu'ensuite on ne voit pas le saccharomyces se multiplier.

Or, on a trouvé dans la pâte levée une ou plusieurs bactéries donnant soit de l'acide lactique, soit une diastase saccharifiante, soit tous les deux.

Certains auteurs leur ont attribué le travail total de la panification.

Boutroux s'est élevé contre cette manière de voir, car, dit-il :

1° La levure se multiplie, puisque le levain en contient toujours ;

2° L'autre microbe cesse de faire lever la pâte après 2 ou 3 passages ;

3° Ce microbe en attaquant le gluten gêne la panification.

D'autre part, Moussette et A. Girard ont retrouvé de l'alcool dans le pain ;

Enfin on peut ajouter comme argument : c'est que souvent on remplace le levain par de la levure pressée.

On voit que des trois opinions : symbiose d'une levure et d'une bactérie, action unique de la bactérie, action unique de la levure, c'est cette dernière que l'on doit admettre.

Métasymbiose.

Pour que certaines fermentations puissent s'effectuer, il faut que le microbe qui les produit trouve le milieu préparé d'avance par un autre ou une série d'autres.

Bière. — Nous en trouvons un exemple dans la bière où la fermentation secondaire ne se développe que dans le milieu préparé par la fermentation primaire.

A cause de cela, il est bien évident que la solution du problème des levures pures en brasserie consiste non pas à isoler telle ou telle race, mais à isoler toutes celles qui concourent utilement à la confection de la bière, et à les mélanger en proportions convenables.

Vin. — La fermentation normale du vin paraît être du même ordre.

Antiseptiques.

On appelle antiseptique une substance qui à dose très faible gêne le développement des microbes et à dose plus forte empêche ce développement.

Cette dose dépend de la nature du microbe et de celle de l'antiseptique, à tel point que certaines substances sont antiseptiques pour un microbe sans l'être pour un autre. La dose dépend également de l'âge du microbe. Ainsi, met-on du chloroforme dans une culture de levure il agit plus fortement sur les vieilles cellules que sur les jeunes; enfin, l'action des antiseptiques dépend encore de la température. Plus la température est élevée, plus les microbes deviennent sensibles aux antiseptiques. Par exemple, si dans une culture à 30°, l'acide fluorhydrique agit sur une levure à la dose de 10 grammes par hectolitre, la même levure à 55° sera sensible à une dose de 7 grammes.

Mode d'action des antiseptiques. — Nous devons alors nous demander quel est le mode d'action des antiseptiques. Il est probable que certains agents agissent sur les éléments des cellules des microbes (1). Cest le cas des antiseptiques métalliques tels que le sublimé, l'arséniate

(1) D'après Mann il y aurait formation d'un phosphate insoluble et fixation du métal sur la membrane cellulosique.

de potasse, le fluorure d'ammonium, c'est le cas des autres corps qui tendent à coaguler le protoplasma tels que le tanin, le formol.

La raison qui permet de supposer que les choses se passent ainsi est la suivante : la dose de ces antiseptiques qui nuit à une catégorie de microbes est proportionnelle au nombre de cellules. De sorte que si le nombre de celles-ci est très grand, toutes peuvent ne pas être atteintes par l'antiseptique qui paraît alors inefficace.

D'autres fois, les antiseptiques doivent agir sur la nutrition des cellules, soit en modifiant les aliments, soit en modifiant les diastases émises par les cellules en vue de leur assimilation. Il existe des cas nombreux de cette manière d'agir.

Prenons par exemple 1 centimètre cube des levures et ajoutons-y goutte à goutte du chloroforme. Il faudra, par exemple, *n* gouttes pour produire l'effet.

Prenons encore 1 centimètre cube d'une culture, mais d'une culture contenant un nombre double de cellules. L'effet se produira encore pour *n* gouttes de chloroforme.

Il y a là évidemment une action soit sur les matières alimentaires, soit sur les diastases, action qui dépend de la concentration des substances ; parmi celles-ci on peut classer le chloroforme, le phénol et le toluène, le sucre et la glycérine à fortes doses.

Il est bien difficile de savoir à quelle catégorie appartient un antiseptique, aussi pour en faire l'étude se borne-t-on à chercher la dose sensible et à étudier l'influence sur les produits de la fermentation de l'introduction de l'antiseptique.

Si l'on met sur une levure un antiseptique à dose très faible, il se passe un phénomène curieux. La multiplication est gênée et le pouvoir ferment augmente. La levure, gênée dans sa multiplication, porte toute son énergie latente vers la puissance fermentative.

Si l'on met une dose un peu plus forte de l'antiseptique, la fermentation se trouve gênée à son tour et enfin à forte dose la vie est arrêtée.

Les doses qui gênent le pouvoir ferment et la multiplication sont très variables, suivant la nature des antiseptiques.

Acides. — Ce tableau indique l'action de quelques acides sur les levures.

	Doses 0/0 qui gênent la fermentation.	Doses 0/0 qui arrêtent la fermentation.
Acide butyrique (1)	0,05	0,10
Acide acétique	0,50	1,00
Acide lactique	1,50	4,50
Acide chlorhydrique	0,10	0,50
Acide sulfurique	0,20	0,70
Acide phosphorique (2)	0,40	7,30

Ce tableau a rapport à la fermentation. Au point de vue de la multiplication, les antiseptiques agissent d'une façon analogue, mais à dose plus forte.

Par exemple, l'acide butyrique gêne la multiplication à la dose de 0,2 pour 100 et l'arrête à la dose de 0,6 pour 100.

Alcools. — Ils paraissent jouer un rôle antiseptique vis-à-vis des levures.

Les teneurs limites pour 100 en alcool sont les suivantes (elles sont relatives à certaines races de levure) :

Alcool méthylique	25 o/o.
Alcool éthylique	15 o/o.
Alcool propionique	2,5 o/o.
Alcool butylique	1 o/o.
Alcool amylique	0,2 o/o.

(1) Dans la série grasse l'acide formique est plus actif que l'acide acétique ; les termes supérieurs sont de plus en plus antiseptiques.

(2) On a essayé l'acide phospho-glycérique.

Autres corps organiques. — Les aldéhydes sont plus antiseptiques que les alcools correspondants ; l'aldéhyde formique (1) est plus active que l'aldéhyde ordinaire, qui a même des propriétés nutritives pour certains bacilles (bac. subtilis). Le maltol (un des produits du touraillage du malt), à la dose de 0,25 pour 100, arrête toutes fermentations, à la dose de 0,1 pour 100 il les gêne.

Corps minéraux. Sels. — Parmi les corps métalliques, le sublimé agit sur la levure à la dose de 2/1,000,000^{e} ; le sulfate de fer à la dose de 10 pour 100, agissant pendant 1 minute sur de la levure, fait baisser le pouvoir ferment du dixième ; une action de 6 minutes fait baisser le pouvoir ferment de moitié.

Aussi doit-on prendre la précaution de nettoyer convenablement tous les appareils de fer.

Le sous-nitrate de bismuth à la dose de $0^{gr},1$ par litre empêche le développement des bactéries sans nuire à la levure. Ce serait une propriété utile si ce corps n'était coûteux et si on ne pouvait obtenir le même résultat autrement.

Sulfure de carbone. — On a préconisé l'emploi du sulfure de carbone à la dose de $0^{gr},1$-$0^{gr},2$ par litre. Il est en réalité antiseptique, mais il est trop inflammable pour être employé utilement.

Acide sulfureux. — L'acide sulfureux (2) a été étudié par M. Linossier, il a trouvé

qu'avec une solution de	$1^{gr},25$	par litre	la levure meurt en	15 minutes.
—	0,25	—		60 —
—	0,10	—		24 heures.
—	0,05	—		plusieurs jours.

(1) Cet aldéhyde ou formol à la dose de 100 grammes par litre arrête la fermentation de la levure ; de 25 à 50 grammes elle ne gêne que les bactéries, avec 10 grammes l'action est insuffisante.

(2) L'acide sulfureux et ses dérivés sont nuisibles en distillerie car il

Cela dépend des espèces, de l'âge, de la pression, de l'agitation, de la nature du moût et surtout de sa richesse en acides minéraux, qui tendent à accentuer l'effet de l'acide sulfureux.

Le bisulfite de soude a été préconisé, il en faut $1^{gr},6$ par litre pour produire un effet antiseptique.

Acide borique. — L'acide borique n'agit pas à la dose de 2 pour 1000 ; il ralentit la fermentation à une dose quadruple et l'arrête à la dose de 1 pour 100 environ.

Les autres acides minéraux ont été cités avec les acides organiques, sauf le plus important de tous, l'acide fluorhydrique, dont nous allons parler maintenant.

De l'acide fluorhydrique. — L'étude des antiseptiques a été faite en particulier pour l'acide fluorhydrique par Effront et Sorel.

On est arrivé aux conclusions suivantes : 1° L'action de l'acide fluorhydrique dépend de l'acidité du moût. Les acides sont en effet par eux-mêmes des antiseptiques. Plus l'acidité sera grande, moins il faudra d'acide fluorhydrique pour arrêter le développement de la levure.

2° L'action de l'acide fluorhydrique dépend de la richesse des milieux. Il est évident, en effet, que lorsque la population de levures est réduite à vivre dans un milieu pauvre, elle offre moins de résistance à l'antiseptique. Par suite, il faut une dose moins forte d'antiseptique pour agir sur elle.

3° La présence d'autres microbes sur lesquels l'acide fluorhydrique a moins d'effet rend sur les premiers l'action de l'acide fluorhydrique plus sensible.

4° Prenons une levure fluorée. Transportons-la brusquement dans un milieu moins fluoré. Le pouvoir ferment

---

se forme de l'hydrogène sulfuré pendant les fermentations, ce qui gâte le matériel et altère l'alcool.

et le pouvoir d'accroissement augmentent. Prenons la levure fluorée et mettons-la dans un moût beaucoup plus fluoré ; elle s'endort. Prenons alors cette levure endormie et remettons-la dans le premier milieu ; elle se réveille.

Prenons une levure dans un milieu fluoré déterminé et avant de la porter dans un milieu plus fluoré, mettons-la successivement dans des milieux intermédiaires de plus en plus fluorés, autrement dit acclimatons progressivement la levure. On pourra la mettre dans le milieu le plus fluoré sans qu'elle s'y endorme. Elle pourra ainsi arriver à supporter une dose d'acide fluorhydrique qui, de prime abord, l'eût tuée.

5° Prenons un moût ordinaire en fermentation. Faisons deux parties de ce moût. Mélangeons la première partie avec un moût contenant 150 milligrammes d'acide fluorhydrique par litre. La fermentation marchera très bien. Mélangeons la seconde partie avec un moût contenant 500 milligrammes d'acide par litre, la fermentation sera beaucoup ralentie.

Prenons alors du moût fluoré à 150 milligrammes par litre en fermentation et mélangeons-le au moût vierge qui contient 500 milligrammes, la fermentation ne paraît pas ralentie. On peut même, avec un moût à 150 milligrammes, ensemencer un moût à 2 000 milligrammes sans que la fermentation s'arrête. Elle est seulement ralentie.

Donc il y a dû avoir acclimatation de la levure et un seul état intermédiaire a été suffisant pour obtenir ce résultat.

6° En pratique, si on habitue une levure quelle qu'elle soit à subir une dose d'acide fluorhydrique, elle perd pour ainsi dire sa personnalité (1) ; elle arrive à supporter

---

(1) Ceci est peut-être une loi de biologie générale et même une loi

des milieux très différents les uns des autres qui par eux-mêmes lui sont particulièrement antipathiques. Elle a moins de puissance d'accommodation pour se plier aux modifications de milieu. Le pouvoir ferment monte et le pouvoir d'accroissement diminue, l'effet produit alors étant le même que celui d'une très faible dose d'antiseptique sur une levure vierge.

7° Enfin une levure acclimatée supporte très mal les modifications de milieu. C'est une conséquence de la perte de leur faculté d'accommodation. En particulier, l'introduction du ferment lactique dans une levure acclimatée nuit beaucoup à celle-ci.

Les produits obtenus avec une levure fluorée ne sont pas les mêmes que ceux d'une levure ordinaire. Il y a toujours moins de glycérine et d'acide succinique.

Des phénomènes du même genre ont été étudiés par Effront pour le ferment lactique et le ferment butyrique. L'acide fluorhydrique agit bien sur ces bactéries à la dose de $7^{gr},5$ par hectolitre sans agir sur la levure.

Kluss a comparé à l'acide fluorhydrique le fluorure d'ammonium, dont il faut à peu près une dose double, et le fluorure d'aluminium (1), dont il faut environ une dose quadruple, ce qui est plus coûteux, mais le départ de la fermentation ne serait pas ralenti, l'acclimatation serait plus rapide.

Il est probable que ce qui vient d'être étudié en détail pour l'acide fluorhydrique est général pour tous les antiseptiques. Il y a cependant un point intéressant à mettre en évidence lorsque l'antiseptique est un corps hydro-

---

sociale; quand une société ne succombe pas à une tyrannie quelconque, elle perd par cela même de sa sensibilité.

(1) Il contient à peu près la moitié d'eau de cristallisation, on le dissout dans 40 fois son poids d'eau bouillante.

carboné, comme un acide gras, par exemple. Une fois l'acclimatation obtenue, l'antiseptique devient un aliment.

Des antiseptiques employés au nettoyage du matériel des distilleries. — Ce que nous venons de dire s'applique aux antiseptiques qui protègent les levures contre les bactéries.

Le problème n'est plus tout à fait le même quand il s'agit du nettoyage du matériel.

On peut très bien employer alors des antiseptiques tuant les levures elles-mêmes, à la condition que ces produits ne soient pas dangereux pour le personnel.

A ce point de vue, un des meilleurs à employer pour les appareils de bois est une solution d'acide sulfurique dans l'eau. Un lait de chaux agit également bien et sur le bois et sur le fer.

Les bisulfites, et en particulier celui de chaux, conviennent très bien pour le lavage du matériel et des planchers.

Une combustion de sulfure de carbone est un excellent désinfectant des bâtiments.

L'antinonine (dinitrocrésylate de potasse), pâte rouge soluble dans l'eau, est employable sur bois ou sur pierre. On utilise des solutions à 5 pour 100.

DEUXIÈME PARTIE

THÉORIE DES APPLICATIONS DE LA MICROBIOLOGIE A LA DISTILLERIE

Nous diviserons cette partie en trois chapitres :
Intervention des moisissures;
Intervention des levures;
Intervention des algues.

INTERVENTION DES MOISISSURES

Les moisissures peuvent en distillerie être considérées à un double point de vue :

Celui de leurs défauts ; celui de leurs qualités.

Elles sont nuisibles lorsqu'elles deviennent destructrices du matériel et des matières premières.

Tel est leur rôle le plus anciennement connu d'où provient sans aucun doute l'opinion défavorable que l'on a eu d'elles jusque dans ces derniers temps où on leur a découvert des propriétés utiles telles que leur action diastasique ou leur faculté de faire fermenter les sucres dans certains cas.

A côté des fonctions nuisibles des moisissures, il conviendra donc d'examiner les services qu'elles peuvent rendre et notre étude sera nécessairement divisée en deux parties :

1° *Du parasitisme des moisissures et 2° de leur utilisation :*

DU PARASITISME DES MOISISSURES

Le rôle parasite des moisissures est d'ailleurs trop connu pour qu'il soit nécessaire d'insister longuement sur ce point.

Tantôt, comme le physare leucope, ou fleur de tan, la moisissure est capable d'altérer le matériel de bois.

D'autres fois, comme les ustilaginées et les uridinées des céréales, comme le péronospora de la pomme de terre ou celui de la vigne, comme l'oïdium de cette plante, comme le penicillium glaucum des fruits secs, les moisissures constituent de véritables maladies pour les matières premières de la distillerie (carie et rouille des céréales, péronospora de la pomme de terre, mildew et oïdium de la vigne, moisissure des fruits secs).

Dans une série de moisissures comme chez le penicillium glaucum, l'aspergillus glaucum, le mucor mucedo, le fusarium hordei et d'autres espèces voisines, le parasite s'attaque aux grains que l'on soumet à la germination, détruit une partie de l'amidon, et crée des produits à odeur de moisi qui, mélangés aux moûts, donnent ensuite de mauvais alcools.

Certaines espèces se retrouvent, d'ailleurs rarement, sur les moûts eux-mêmes, telles sont le botryris cinerea, l'oïdium lactis qui causent encore ici une perte de matière.

Lorsqu'il s'agit de matériel ou des matières premières récoltées, tous les inconvénients que je viens de signaler sont faciles à éviter par l'application du principe de la propreté absolue des usines, et du nettoyage complet des matières premières.

Les moisissures qui attaquent les matières premières sur pied, telles que celles de la rouille ou du mildew, sont

plus difficile à détruire. Seulement c'est le rôle de l'agriculteur d'intervenir dans ces cas spéciaux. Ce serait évidemment sortir du cadre de cette étude que d'empiéter sur le domaine de la culture. Il n'y a donc pas lieu ici d'approfondir la question des parasites des plantes sur pied, de sorte que tout ce que nous avons à dire des moisissures nuisibles revient à recommander la propreté des matières premières, des bâtiments et des appareils.

APPLICATIONS UTILES DES MOISISSURES

Les applications des moisissures reposent sur deux propriétés qu'elles possèdent :

1° Dans certains cas, elles peuvent émettre des diastases capables d'agir sur l'amidon ou sur certains sucres ;

2° Dans certaines conditions, elles peuvent produire de véritables fermentations.

Utilisation du pouvoir diastasique.

D'après ce que nous avons dit dans la première partie de ce livre, nous savons que les moisissures capables de produire des diastases en produisent le maximum lorsqu'on les met dans les meilleures conditions de vitalité, c'est-à-dire en présence d'un milieu très nutritif, contenant de la substance à hydrolyser, très aéré et dans de bonnes conditions de température.

Mais ce sont là les conditions de production des diastases à l'intérieur de la moisissure. En général les diastases doivent agir extérieurement ; il faut donc se mettre dans les meilleures conditions de diffusion.

Ces conditions sont pour ainsi dire contraires de celles de la grande production.

Il y a maximum de diffusion lorsque la matière alimen-

taire et l'air viennent à manquer, au moment, en définitive, où la moisissure consomme ses aliments de réserve.

Utilisation de la propriété de faire fermenter.

Nous savons que les moisissures privées d'air acquièrent le pouvoir ferment, et nous avons à ce sujet fait une remarque très importante. Ces moisissures ne peuvent subir la vie anaérobie absolue, elles continuent à exiger une certaine dose d'oxygène et c'est pour cela, qu'en général, les rendements rapportés à la quantité primitive de sucre ou d'amidon sont très faibles, 60 et même 40 pour 100 de ce qu'ils pourraient être.

En d'autres termes, les moisissures conservent en vie anaérobie un pouvoir comburant qui n'est pas négligeable.

Ce qui caractérise toutes les fermentations dues aux moisissures c'est, outre cette nécessité d'une faible dose d'air, la lenteur de la fermentation et la limite ordinairement basse de la teneur en alcool qu'elles peuvent supporter.

Nous avons dans la partie théorique cité les limites supérieures d'alcool supporté par les différentes moisissures.

Rappelons par exemple que M. Calmette a montré qu'en six jours, par l'amylomyces sur du moût de bière, on obtient 2,4 volumes d'alcool.

Dans les conditions les plus favorables, la moisissure en question ne peut supporter plus de 7 volumes.

Un autre caractère des fermentations par moisissures est une très grande sensibilité à l'influence du milieu.

Ainsi Boidin et Rolants ont étudié l'action de l'oxygène et de l'acidité sur l'amylomyces cultivé sur des vinasses de distillerie.

Ils ont vu que la culture en profondeur développe plus de moisissures que la culture en surface et celle-ci moins que la culture aérée;

Que la culture en profondeur développe plus d'acidité que la culture en surface ou aérée; que la dose d'acide produit est d'autant plus faible que l'acidité initiale est plus forte.

Dans un milieu neutre c'est la culture en profondeur qui donne le plus d'alcool; dans un milieu à 3gr,4 d'acide sulfurique par litre, c'est la culture superficielle qui tient la tête.

En milieu neutre, c'est la culture superficielle qui détruit le moins de sucre parce qu'elle brûle moins qu'en milieu aéré et donne moins d'alcool qu'en culture profonde.

Mais en milieu acide la culture en profondeur détruit autant de sucre que la culture superficielle, quoique donnant moins d'alcool.

Sanguinetti a entrepris une étude comparative des effets de l'aspergillus oryzæ, de l'amylomyces Rouxii, et d'un mucor, le mucor alternans.

Les expériences qui ont porté sur des milieux ne contenant que 3 pour 100 d'amidon ou de dextrose, ou que 10 pour 100 de saccharose ont montré :

1° Que d'abord seul l'aspergillus peut agir sur la saccharose, mais en dix jours, à peine les 2/3 du sucre ont-ils disparu. De plus, on est loin de recueillir tout l'alcool possible, la perte est de 16 pour 100;

2° Que sur les milieux dextrineux et amylacés toutes les moisissures laissent au bout de dix jours un résidu d'hydrate de carbone; c'est l'aspergillus qui donne le moindre résidu; c'est l'amylomyces qui donne le plus de résidu, tout en fournissant le maximum d'alcool, parce que son pouvoir comburant est le plus faible.

Au point de vue pratique, les conséquences à tirer de ces faits sont les suivantes :

Si, comme dans les expériences de Sanguinetti, on ne prolonge pas l'opération au delà d'une certaine limite, il y aura toujours de la matière première non transformée.

Si, au contraire, on prolonge les opérations, le pouvoir comburant continuant alors à s'exercer, on détruira bien toute la matière première, mais sans grand profit au point de vue du rendement en alcool.

Association avec les levures.

D'où l'idée d'associer à la moisissure employée une levure opérant parallèlement sur les hydrates de carbone et en particulier sur l'hydrate de carbone résiduel : M. Calmette, avec l'amylomyces additionné de levure, a pu doubler le rendement en alcool.

Cette idée peut être d'ailleurs considérée comme provoquée par la pratique. Car l'étude des boissons fermentées faite avec les moisissures en question a montré la présence, à côté de ces moisissures, de *levures* particulières provenant sans doute du développement de races mélangées aux races de moisissures, ou peut-être de la transformation des cellules de moisissures en cellules de levures, si toutefois l'on adopte les idées de transformisme dont nous avons parlé plus haut.

Relativement à la présence des levures, à côté des moisissures, je donnerai quelques détails :

C'est Korschelt qui, le premier, a signalé des levures dans le koji et le moto, c'est-à-dire dans la culture des spores diastasiques et dans le levain utilisés pour le saké ; Schieweck a trouvé plusieurs sortes de levures dans les mêmes produits.

Dans la levure chinoise, M. Calmette a montré qu'un ensemencement sur plaque de gélatine produit 8 colonies d'amylomyces, 20 de levures et 30 de bactéries.

De même, dans l'arrak, boisson faite avec de la mélasse

de cannes, dont on entraîne la fermentation par un levain fabriqué à l'aide de riz cuit et d'aromates, à côté des organismes dont nous avons parlé, se trouve une levure le S. Vordermanii capable de détruire 18 pour 100 de sucre en trois jours à 30°, et résistant à 10 volumes d'alcool.

L'idée d'ajouter une levure aux moisissures est donc non seulement logique, mais trouve encore un appui dans la pratique la plus empirique.

A l'aide de cette association formée par la moisissure et la levure, on peut donc espérer amener la fermentation complète de l'hydrate de carbone dans un temps relativement court.

Mais il y a un point faible à la méthode ; surtout dans les pays où l'impôt est basé d'après la capacité des cuves.

Étant donnée la faible teneur en alcool que les moisissures supportent, il faut partir de moûts très dilués, ce qui est coûteux au point de vue de l'impôt, si l'impôt est proportionné à la capacité des cuves, et au point de vue de la dépense de combustible employé à la distillation.

Il est vrai qu'on peut espérer acclimater les moisissures à supporter plus d'alcool et c'est ce qui semble être arrivé pour l'amylomyces qu'on ne travaillait au début que dans des moûts contenant 10 à 12 kilogrammes de grains par hectolitre, tandis qu'aujourd'hui on emploie d'autres microbes travaillant jusqu'à 18 et 20 kilogrammes.

Conditions d'un travail mixte, moisissures et levures. — Il résulte de tout ce qui précède que les conditions à réaliser pour un travail mixte par moisissures et levures sont les suivantes :

1° Amener la plus grande production possible du ferment soluble, en cultivant la moisissure en milieu aéré, à température convenable (ordinairement fort élevée), sur un milieu de culture très nutritif contenant la matière à

transformer par la diastase, c'est-à-dire en général l'amidon, et j'ajouterai l'amidon à l'état d'empois ou même légèrement saccharifié, soit par un peu de moisissure ou de malt sacrifiés, soit par un peu d'acide;

2° Amener la diffusion de l'enzyme et produire la fermentation en milieu peu aéré (1), à une température plus basse que celle de la production de diastase, température supportée par la levure employée concurremment avec la moisissure;

3° Utilisation de races de moisissures acclimatées à une forte dose d'alcool et de levures acclimatées à la plus haute température possible, puisque les moisissures préfèrent ordinairement les températures élevées.

Étant donnée cette considération de la température, il faudra opérer en cuves fermées, pour éviter la contamination par les microbes extérieurs, et pour éviter la vaporisation de l'alcool. On profitera de cette nécessité pour opérer sur des moûts et dans des cuves aseptiques.

Ceci sera toujours un avantage par rapport au travail au malt car on ne peut stériliser celui-ci, tandis qu'on peut stériliser un moût avant d'y inoculer une moisissure en culture pure.

Étude spéciale des différents cas.

Nous allons passer en revue les différents cas, où la distillerie fait appel aux propriétés précédentes des moisissures.

Utilisation de l'aspergillus oryzæ. — **Koji.** — Au Japon on fabrique avec les spores de cette moisissure

---

(1) Pour augmenter cette diffusion il faut affamer les moisissures. L'idéal est donc d'avoir un moût constitué de telle manière qu'épuisé relativement à la moisissure, il soit encore nutritif pour la levure.

appelées koji, une boisson de riz fermentée, le saké (1), qui est bue en nature et qui n'est pas à ce point de vue du domaine de la distillerie. Mais la drèche en est distillée à la vapeur pour en tirer l'alcool résiduel, de sorte que le saké peut passer pour un moût de distillerie.

α) **Préparation du koji.** — Les grains de riz, nettoyés, battus, trempés douze heures, sont cuits à la vapeur, puis étendus sur des nattes que l'on remue souvent pour empêcher la formation de grumeaux (2).

On ensemence avec les spores brunes de l'aspergillus orizæ dans la proportion des 0,025 pour 100 de riz, et on agite longtemps pour incorporer les spores au riz.

On porte aux germoirs, constitués par des galeries de mine ayant un peu plus de 2 mètres de large et $1^m,20$ de hauteur. Ces galeries sont branchées sur une artère principale. Le riz est mis en tas dans le germoir, recouvert de nattes et abandonné une nuit; le lendemain on l'asperge et on fait des couches minces ; le troisième jour on reforme les tas. Après 4 heures un mycélium s'est développé. On étale de nouveau en couches minces sur des nattes que l'on secoue pour empêcher les formations de grumeaux et le 4e jour on récolte les spores qu'on recueille dans du papier.

La température du germoir varie avec les saisons entre 24° et 27° (au besoin on chauffe); les grains qu'on y porte sont à 28°-30°; le second jour après l'aspersion, ils sont à 23°-26°, mais leur température s'élève et le lendemain matin ils atteignent 40°; la mise en couches minces fait baisser la température, mais celle-ci remonte vers 37°-39°.

---

(1) On fabrique aussi une sorte de sauce avec le soja hispid ; on s'en sert aussi pour faire lever le pain.

(2) On y ajoute souvent la cendre d'une sorte de camélia.

On voit qu'il y a une différence considérable entre la température du riz et celle du germoir.

Une 2e méthode permet de récolter le koji en 3 jours; on laisse le riz cuit au germoir pendant 24 heures, la température s'élève alors à 40° ; on fait des tablettes que l'on porte dans un endroit chaud et qu'on pétrit après 12 heures pour en renouveler les surfaces. Dans ces conditions, les spores peuvent être récoltées après trois jours.

Le koji qui doit servir à faire le saké est d'abord incorporé à une sorte de levain, le moto.

β) **Fabrication du moto.** — On fait un mélange de 68 de riz, 72 d'eau, 21 de koji que l'on brasse toutes les 2 heures à 20°; après trois jours on coupe la masse en deux et on y incorpore du riz cuit; on brasse de nouveau toutes les deux heures pendant un jour, on coupe, on incorpore un supplément de riz cuit et des aromates; on continue à brasser pendant 3 jours.

Cela fait une période de travail de 7 jours pendant lesquels l'amidon tend à se dissoudre en formant de la dextrose et un peu de dextrine. C'est le moment où la plante se développe en donnant beaucoup de diastase.

Lorsque cette période est terminée, on réunit les 4 cuvées, ce qui diminue l'influence de l'air; on réchauffe à 25° et on laisse la fermentation s'établir. Après une dizaine de jours, le moto est terminé, il contient environ 85 pour 100 d'eau, 12 pour 100 d'amidon non attaqué, 0,5 pour 100 de dextrose, 2,5 pour 100 de dextrine et 10 pour 100 d'alcool.

γ) **Fabrication du saké.** — On mélange du moto avec du riz cuit; ici, la fermentation marche parallèlement à la saccharification, d'abord lentement, puis très vite; l'opération dure environ 25 jours.

On obtient un moût contenant en moyenne 4 pour 100 d'amidon non dissous, 0,5 pour 100 de dextrine et jusqu'à 14 ou 15 pour 100 d'alcool.

Les moûts sont filtrés et livrés à la consommation immédiate ou pasteurisés à 50°-60°.

Les drèches rentrent dans le travail ou sont distillées à la vapeur.

Remarque. — On trouve à côté de l'aspergillus des saccharomyces qui jouent sans doute un rôle dans la fermentation.

Travaux de Takamine. — Takamine a fabriqué une sorte de koji : 1° en remplaçant le riz par d'autres grains et 2° en y ajoutant un mélange nutritif de sels.

On opère à 30° pendant 1 jour ou 36 heures, puis on abandonne la masse dans une atmosphère humide.

Lorsque les spores sont formées on sèche à basse température et on tamise pour séparer les spores qui peuvent servir comme agent de fermentation.

En cultivant le koji sur des drains bien stérilisés dans des conditions très voisines des précédentes, puis en séchant le tout à 50° et tamisant les spores, il reste une drèche portant le mycélium qui joue un rôle saccharifiant. C'est le taka koji qui peut remplacer le malt. On en emploie un extrait fait à froid, tandis que le résidu solide est cuit à la vapeur et réintroduit dans la fabrication.

Cet extrait est employé avec les matières amylacées cuites à la vapeur et ramenées à 65°-70°, cela dure 1 heure; on refroidit le moût à 20° et on y incorpore un levain (2-10 litres par hectolitre de moût). Ce levain est un moût d'abord saccharifié par du takakoji à 60° pendant une heure, ramené à 20° et ensemencé avec une nouvelle quantité de takakoji et avec de la levure mère.

Takamine a aussi proposé :

1° de faire un extrait aqueux de takakoji;

2° d'y incorporer un extrait de son, de grains crus, etc.;

3° de précipiter à l'alcool;

4° de laver à l'alcool et à l'éther.

Effront a refait cette expérience, le produit obtenu est

peu actif car la filtration est très difficile et le produit s'altère. De plus l'addition des substances inertes augmentait le pouvoir saccharifiant et non le pouvoir liquéfiant.

Enfin Takamine a eu l'idée d'augmenter la surface de culture en mélangeant à la masse des fragments de pierre ponce, ou du sable.

Utilisation de l'ustilago. — Le même Takamine a proposé dans des conditions analogues la culture de l'ustilago dont les spores seraient utilisées pour le travail du maïs.

On fait la culture sur un mélange de 8 de sable, 1 d'eau, 1 d'amidon. Les spores sont utilisables en 36 heures, mais on conserve une partie de la culture pendant 6 à 8 jours pour ensemencer la suivante.

Moisissures de l'arrak. — L'arrak est une boisson alcoolique faite avec de la mélasse de canne mise en fermentation à l'aide d'un levain analogue au moto.

On a trouvé dans cet arrak, du mucor racemosus (Clamydomucor de certains auteurs) qui saccharifie l'amidon et un autre mucor (rhizopus oryzæ, analogue ou identique au mucor stolonifer) qui saccharifie la dextrine. Il y a également une monilia qui paraît faire fermenter la maltose et la dextrose (M. Javanica) et une levure (Saccharomyces Vordermannii) capable de détruire 18 pour 100 de sucre en trois jours à 30° et résistant à 10 volumes d'alcool.

Utilisation de l'amylomyces Rouxii. — **Emploi en Chine.** — En Chine et en Cochinchine on prépare le choum-choum, eau-de-vie de riz marquant 32°-42°.

On se sert d'un ferment désigné sous le nom de men ou de migen.

Cette levure chinoise est fabriquée en Chine et au Cambodge avec du riz ou des haricots ou du maïs réduits en farine. En Cochinchine on n'emploie que le riz.

On réduit en farine du riz décortiqué et pulvérisé dans un mortier. D'autre part on pulvérise un mélange de 46 plantes aromatiques où l'on remarque entre autres la cannelle et le clou de girofle.

On triture ensemble les deux poudres avec de l'eau dans une auge circulaire de manière à former une pâte molle.

On en fait des galettes épaisses d'un centimètre que l'on enrobe de balles de riz et qu'on pose sur des nattes. Ces nattes placées sur des étagéres, couvertes de paillassons, sont laissées dans une pièce à 28°-30°.

La moisissure se développe sous forme de duvet et après 2 jours on sèche les galettes au soleil.

Voyons maintenant la confection du moût. On emploie 18 kilogrammes de riz, en partie décortiqué par le passage sous des meules de bois, et que l'on mêle avec 22 litres d'eau dans une chaudière chauffée par un feu de bois. Cette chaudière est fermée : 1° par une natte, 2° par un couvercle.

On cuit 2 heures, le riz est étendu sur des nattes, on le saupoudre de levure pulvérisée et on l'installe dans des pots en terre d'une vingtaine de litres qu'on remplit à moitié. On ferme les pots; après trois jours la saccharification est faite. On remplit les vases avec de l'eau, la fermentation commence et est terminée au bout de 48 heures.

On distille dans des alambics formés d'une bassine en tôle, d'un dôme en bois, d'un chapiteau en terre, d'un tube de bambou long de $2^{m},50$ incliné à 45° et qui se rend dans des récipients plongés dans des bassines d'eau froide.

Les alambics sont chauffés à feu nu sur le même massif que la chaudière à cuire le riz. Avec 100 kilogrammes de riz et $1^{kgr},500$ de levure on obtient 60 litres d'alcool à 36° en moyenne.

Emploi de l'amylomyces en Europe. — Boidin et Rolants ont montré d'abord qu'en cultivant sur des vinasses stérilisées de l'amylomyces on peut tirer 1 litre d'alcool à 90° par hectolitre de vinasses.

Boidin et Colette ont ensuite institué une méthode de fermentation directe des moûts amylacés par l'emploi de l'amylomyces. Nous allons ici indiquer seulement le principe des opérations en tant qu'application de la microbiologie, réservant la technique pour un autre ouvrage. On commence par préparer un moût de maïs en le cuisant avec 2 fois son poids d'eau et en élevant en trois heures la pression à 4 atmosphères; le moût pourrait naturellement être fait d'autres grains que le maïs.

On installe d'autre part dans une cuve matière un lait de malt formé d'environ 1 de malt vert pour 100 de maïs travaillé et on y envoie le maïs tout en ayant soin d'aller assez lentement pour que la température ne dépasse pas 70°.

Après environ une heure de malaxage, le maïs est liquéfié. On l'envoie alors dans un autoclave à 2 atmosphères où on le chauffe à 120° ce qui le stérilise.

Remarque. — C'est le caractère spécial de ce mode de travail de pouvoir stériliser le moût. En effet la diastase n'est plus utile, tandis que, dans le cas d'un moût au malt ordinaire où la diastase n'a donné qu'un mélange de maltose et de dextrine infermentescible, il faut conserver cette diastase jusqu'à la fin de la fermentation et par conséquent on ne peut à aucun moment chauffer trop fort le moût.

Le moût stérilisé est envoyé dans des cuves que nous ne décrirons pas ici en détail ; qu'il suffise de savoir qu'elles portent un agitateur, un appareil d'injection d'air et un appareil d'injection de vapeur.

Le remplissage de la cuve se poursuit au fur et à mesure des stérilisations ; la première charge est acidulée d'acide

sulfurique qui est calculé de manière à neutraliser toute la charge de la cuve; tant que dure le chargement on fait bouillir le liquide de la cuve, cela le stérilise et cela tue les spores qui peuvent être adhérentes à la paroi de l'appareil, car elles sont entraînées par l'eau de condensation de la vapeur dans de l'eau acidulée bouillante.

On arrête alors la vapeur, on la remplace par de l'air stérile de manière à avoir à l'intérieur un léger excès de pression: il n'y a donc pas de rentrée d'air par les joints.

On refroidit à 38° la cuve par une pluie d'eau (il faut 5 heures). On fait l'ensemencement de l'amylomyces par une tubulure; la quantité employée est réellement très faible pour le volume de 1 000 hectolitres des cuves: on emploie 1 ou 2 cultures faites avec environ 100 grammes de riz cuit. Dès que l'ensemencement est réalisé, on fait marcher l'agitateur et on injecte de l'air.

Cela a pour but de noyer le mycélium et de réduire au minimum la quantité d'amidon brûlé.

Après 20 heures, il n'y a pas une goutte du liquide qui ne contienne du mycélium; il y a encore une forte proportion d'amidon. Au début on avait songé à faire la fermentation par la moisissure, on laissait donc celle-ci se développer mais il y avait combustion considérable d'amidon et grande lenteur de l'opération.

Actuellement, vers la vingtième heure on cesse l'injection d'air, on refroidit le masse à 33° et on ensemence une levure pure convenable. Pendant le début de la fermentation il y a de l'amidon résiduel, mais après 3 jours tout l'amidon est fermenté.

Le pouvoir réducteur du moût va en augmentant après l'addition de levure puis il redescend vers zéro qu'il atteint le 8e jour. Donc le pouvoir saccharifiant s'exerce concurremment avec le pouvoir ferment, il a même l'avance au début.

On sait que le danger de la méthode est une infection

de la grande masse de moût, soit que celui-ci ait été mal stérilisé, soit qu'on introduise des semences impures.

On a soin de constater la stérilité du moût, en en recueillant dans des tubes stériles et en mettant ceux-ci à l'étuve. De même on examine au microscope les semences et on les essaie en petit sur des moûts stériles. Enfin disons qu'on complète la fabrication en filtrant les vinasses riches en mycélium et en extrayant l'huile.

Quant à la discussion de la méthode nous la donnerons dans le volume traitant de la distillerie proprement dite. Ici nous voulons nous borner à indiquer une application excessivement importante de la microbiologie.

INTERVENTION DES LEVURES

Nous étudierons successivement les méthodes utilisables pour se procurer la levure et leurs modes d'intervention dans les moûts.

DIFFÉRENTES SOURCES DE LA LEVURE NÉCESSAIRE

Pour faire fermenter un moût sucré ne contenant aucune impureté, il faudrait un poids de levure considérable (20 pour 100 du poids de sucre). Mais les moûts ne sont jamais purs et contiennent des matières alimentaires qui permettent à la levure de se multiplier. L'on peut dire que pour faire fermenter un poids de moût donné il faut au maximum un poids de levure convenablement pressée égal à 1,5 pour 100 du poids du sucre contenu dans le moût.

Si l'on a peu de moût, il est souvent inutile de mettre de la levure, l'ensemencement spontané ayant générale-

ment lieu soit par l'air, soit par les pellicules des matières premières. Il n'en est pas de même si l'on a une grande quantité de moût à faire fermenter, on est alors obligé d'avoir recours à une production artificielle de levure.

Ordinairement pour la première cuve on se procure cette levure, soit par achat de la quantité nécessaire de levure de brasserie, ou de levure pressée, ou de levure séchée avec précaution à 42°, soit par achat d'une première semence de levure à multiplier soi-même.

Dans ce cas on peut ou isoler la levure produite ou la laisser dans son bouillon de culture qui constitue alors un levain. On peut d'ailleurs multiplier de la levure ordinaire ou des levures pures sélectionnées.

Pour les cuves suivantes, on emploie le même procédé coûteux que pour la première, à moins qu'on ne puisse utiliser la méthode des coupages qui consiste à amorcer une cuve avec un fragment de la précédente.

Cette méthode des coupages n'est pas toujours possible. Il faut que le moût travaillé soit suffisamment nutritif, car en milieu pauvre la levure ayant fait fermenter une cuve serait trop affaiblie pour faire fermenter aussi activement la suivante; d'ailleurs cet effet d'étiolement s'accentuerait de cuve à cuve.

Il faut bien remarquer que par moûts nutritifs, il faut entendre non seulement des moûts qui contiennent les matières alimentaires, mais aussi des moûts qui ne contiennent pas en outre des matières nuisibles.

C'est ainsi que le moût de mélasse ne peut pas être coupé. Ce n'est pas comme on peut le croire *a priori* parce que l'opération de dénitrage qui consiste en une ébullition avec l'acide sulfurique l'a trop appauvri en azote. En effet il reste très suffisamment d'azote pour la nutrition de la levure. C'est par suite d'un état de toxicité relative pour les levures que celles-ci malgré les

matières alimentaires tendent à s'étioler dans la mélasse.

Effront a préconisé un mode de travail par coupage; il produit à cet effet une levure suffisamment active, c'est-à-dire suffisamment riche en sucrase et acclimatée au milieu spécial fourni par la mélasse.

Les moûts de betteraves, de grains, de pomme de terre sont, au point de vue de l'alimentation des levures, susceptibles d'être coupés; mais en ce qui concerne les moûts amylacés, il faut tenir compte des considérations suivantes :

1° En général on les travaille en moûts concentrés par suite de raisons fiscales et par raison d'économie de place, or il y a difficulté matérielle à effectuer des coupages sur des moûts concentrés qui sont fatalement très épais puisque l'introduction d'une plus grande quantité d'amidon entraîne celle de plus de drèche.

2° Ces moûts concentrés ont fatalement une fermentation prolongée, ils risquent donc d'autant plus les contaminations extérieures; le coupage perpétuerait ces accidents s'ils se produisaient sur une seule cuve.

3° Les moûts épais doivent en général être terminés dans un temps fixé par la loi (par exemple: 72 heures en Allemagne, autrefois 24 ou 48 heures en Belgique, etc.), il faut donc des levures actives. Dans ce but on prépare les levures à part, mais ni les moûts de grains, ni ceux de pomme de terre ne sont capables de maintenir leur activité. De plus, en ce qui concerne les pommes de terre, quand on veut faire des moûts épais, non seulement on emploie plus de pommes de terre, mais on recherche les espèces les plus riches en fécule, qui sont les plus pauvres en azote, de sorte que dans ces moûts le rapport azote à fécule est plus bas que dans les moûts moins concentrés.

Il résulte de ce fait une deuxième raison qui n'existe pas pour les grains et pour laquelle la levure ne garde

pas dans les moûts de pommes de terre toute l'activité nécessitée par les coupages.

Nous étudierons la théorie de la production de la levure pour l'usage des distilleries en trois chapitres :

1° Achat de levure sous différentes formes;

2° Multiplication de la levure à l'intérieur des distilleries;

3° Multiplication industrielle de la levure en vue de la vente directe.

ACHAT DE LEVURE

La levure achetée peut être de la levure de brasserie, de la levure pressée, de la levure séchée, de la levure pure.

Levure de brasserie.

La bonne levure de brasserie présente les caractères suivants :

1° Elle renferme moins de 80-85 pour 100 d'eau (bon égouttage) ;

2° Elle présente l'aspect d'une crème au café;

3° Elle possède des reflets brillants et de petits yeux ;

4° Elle est douce et onctueuse au toucher;

5° Elle a l'odeur de bière;

6° Elle est propre, non additionnée de matières étrangères, telles que le sucre, la mélasse, le charbon, la glycérine, la fécule, etc. ;

7° Examinée au microscope, elle ne doit pas contenir trop de cellules mortes ou vieilles; ces cellules se reconnaissent, nous le savons, à ce qu'elles sont ratatinées, ont un protoplasma granuleux et des vacuoles plus grandes que la moitié du volume des cellules;

8° Elle doit posséder une force fermentescible suffisante.

Détermination du pouvoir fermentescible d'une levure. — **Essai préliminaire.** — Un gramme de la levure est mis dans un litre de moût à 30°; on attend, si la levure est bonne on a une mousse abondante après 20 minutes, si elle est mauvaise la mousse ne s'est pas encore produite après 45-50 minutes.

Mesure de la force fermentescible. — **Par mesure de l'acide carbonique.** — On mesure ordinairement la quantité d'acide carbonique que donne un poids donné de levure.

Pesée indirecte. — Cette mesure peut s'opérer par perte de poids. A cet effet on place dans un vase conique :

50^cc	d'eau.
4^gr	de sucre.
0^gr,25	de phosphate d'ammoniaque.
0^gr,25	— de potasse.
1^gr	de la levure à essayer.

On ferme le vase avec un bouchon de caoutchouc portant un appareil destiné à retenir l'eau entraînée (tube à chlorure de calcium, ou à ampoule d'acide sulfurique).

On pèse le système, on le met à l'étuve à 30° et le lendemain, lorsque la fermentation est terminée, on pèse à nouveau; par précaution on remet à l'étuve et plus tard on fait une 2e pesée qui doit être identique à la première.

La perte de poids indique la production d'acide carbonique.

Meissl emploie la méthode précédente en réduisant à 6 heures la durée de l'opération. Il appelle levure normale à 100° celle qui a dégagé pendant ce temps 1^gr,75 d'acide carbonique. S'il s'en est dégagé seulement p la levure est dite à $\frac{p}{1.75}$ pour 100.

Levuromètre Billet. — Le levuromètre Billet est un appareil où l'on évalue la perte de poids effectuée par une fermentation d'essai en un temps déterminé. Mais il

n'y a pas de précautions prises contre l'évaporation, de sorte que l'appareil est de graduation empirique.

C'est un aéromètre creux qu'on place dans l'eau à 30° et dans lequel on introduit :

1° 50 centimètres cubes de la solution sucrée suivante :

Sucre.	300gr
Phosphate d'ammoniaque.	1gr,50
Chlorure de potassium.	1gr,25
Acide sulfurique.	5gr
Eau quantité suffisante pour faire 1 litre.	

2° 5 grammes de levure délayée dans 20 centimètres cubes d'eau ;

3° Assez d'eau pour faire affleurer l'appareil au zéro qui est placé vers la partie supérieure de la tige.

On note l'heure du remplissage et quatre heures après l'appareil étant remonté, on lit la division d'affleurement ; or, chaque degré vaut 1gr,60 de sucre ou 1 centimètre cube d'alcool.

Mesure du volume. — Pour évaluer l'acide carbonique on peut en mesurer le volume. On peut employer par exemple le levuromètre de Scheibler. C'est une sorte de baromètre à siphon terminé par une ampoule qui sert de ballon de culture; la branche libre forme entonnoir pour le remplissage. On lit à même l'appareil le volume dégagé.

L'appareil d'Hayduck se compose d'un flacon rempli d'une solution sucrée à 10 pour 100 et de 20 grammes de levure de brasserie, il est en communication avec un tube gradué rempli d'eau couverte d'une couche de pétrole et d'où le liquide peut sortir par un siphon. On chauffe le flacon au bain-marie 30 minutes et on mesure la quantité d'eau déplacée dans le tube ; 1 centimètre cube est équivalent à 0,00384 de sucre décomposé.

Interprétation des résultats. — Tous les appareils précédents doivent surtout être considérés comme des appa-

reils de comparaison de levures les unes par rapport aux autres.

Cependant ils peuvent donner des indications absolues moyennes.

Par exemple, dans l'appareil d'Hayduck, 20 grammes de levure de bière donnent environ 300 centimètres cubes d'acide carbonique.

Levure pressée.

La levure pressée doit remplir les conditions suivantes :

1° Être blanche, sans veines jaunes ;

2° D'odeur aigrelette, non putride ;

3° Contenir au moins 30 pour 100 de matière sèche et être exempte d'amidon ;

4° N'avoir pas plus de 0,7 pour 100 au très grand maximum d'acidité (en acide sulfurique) ;

5° Avoir une force fermentescible convenable ;

6° Ne pas contenir trop de cellules vieilles ou mortes ;

7° Ne pas contenir de ferments étrangers ;

8° Ne pas contenir de levures basses.

Teneur en eau. — Relativement à la teneur en eau, il y a une remarque importante à faire.

Une levure pressée pure contient à l'état frais 70-72 pour 100 d'eau ; mais avec le temps elle se dessèche.

D'autre part, lorsqu'on introduit de l'amidon dans une levure, comme l'amidon est moins hygrométrique, qu'il ne retient que 45 pour 100 d'eau, l'ensemble sera moins aqueux.

Par exemple, 10 pour 100 d'amidon donnera une humidité de

$$\frac{70 \times 90 + 45 \times 10}{100} \, \% = 67,5 \, \%.$$

De sorte qu'il peut y avoir confusion entre une levure

pure un peu sèche, et une levure mêlée d'amidon mais fraîche.

Sur la présence de la levure basse dans la levure pressée. — La levure pressée est une levure haute, on la fraude en la mélangeant à de la levure basse.

Essai qualitatif. — Voici la manière de reconnaître cette fraude. On s'appuie sur les deux faits suivants :

1° La levure haute ne fait pas fermenter complètement la raffinose. Il reste de la mélibiose réductrice ;

2° La levure basse fait fermenter la mélibiose.

Il suffit donc de faire agir la levure et de voir si elle laisse un sucre résiduel.

On peut opérer de la façon suivante :

Méthode des colonies non réductrices. — Prenons la levure et faisons-en une dilution de manière à pouvoir faire un ensemencement sur gélatine raffinosée. Examinons les colonies développées.

Celles provenant de la levure haute sont encore réductrices ; celles provenant de la levure basse ne le sont plus. On fait un essai des différentes colonies avec de la liqueur de Fehling.

Méthode des colonies à flocons. — Un autre moyen consiste à faire une culture sur gélatine, à découper les colonies et les jeter dans l'eau. Les colonies de levure basse forment des flocons ; celles de levure haute se disloquent.

Essai quantitatif. — On peut enfin faire un essai quantitatif. On commence par faire un premier essai basé sur l'action vis-à-vis de la raffinose. On prend 10 centimètres cubes de raffinose à 1 pour 100 et on les met dans un levuromètre avec $0^{gr},4$ de levure à essayer. On laisse 4 jours. Il se dégage de l'acide carbonique.

Si on a une levure haute, le gaz s'est dégagé aux dépens de la lévulose.

Si on a une levure basse, il s'est dégagé aux dépens de la lévulose et de la mélibiose ; il y en a donc plus.

Si on trouve 2 centimètres cubes à $2^{cc},5$ de gaz, on est à peu près sûr d'avoir une levure haute, c'est-à-dire de la levure pressée pure.

Si on trouve 5 centimètres cubes, il y a au moins 5 pour 100 de levure basse.

Supposons qu'on ait poussé la fraude jusqu'à mélanger à la levure haute de la vieille levure basse, elle passera pour levure haute car elle fermente moins bien. Cela nécessite un second essai.

On prépare trois opérations semblables à la précédente et on les met à l'étuve. On regarde la première au bout de 24 heures. On filtre le liquide ; on en prend 3 centimètres cubes qu'on fait agir sur 1 centimètre cube de Fehling à $62^{gr},28$ par litre et on chauffe 5 minutes.

Supposons qu'il n'y ait pas décoloration. C'est une preuve qu'il y a relativement peu de mélibiose, c'est-à-dire qu'il y a beaucoup de levure basse (plus de 10 pour 100).

S'il y a décoloration, on attend au lendemain et on observe après 48 heures le 2e tube.

S'il est bleu, on peut compter sur plus de 5 pour 100 de levure basse.

S'il est décoloré, on attend au lendemain et si le 3e tube est bleu on peut compter sur plus de 1 pour 100 de levure basse, et s'il est décoloré sur moins de 1 pour 100.

Levure séchée.

La levure sèche est une levure pressée découpée en tranches et séchée lentement jusqu'à 42°; elle est employée aux colonies.

Elle doit ne pas être putréfiée.

Elle est naturellement peu active.

On doit essayer son pouvoir fermentescible.

Levures pures.

Principe de leur emploi. — On a pensé donner à un moût quelconque un goût vineux en ensemençant ce moût avec une levure de vin, on espérait en même temps que l'alcool correspondant aurait le goût de cognac. Quoique les moûts acquièrent une vague odeur vineuse, l'idée est fausse quant à l'alcool, parce que les levures sélectionnées mises dans un milieu différent de celui où elles ont été prises par la nature, la température, la non asepsie finissent par dégénérer ; en outre, les cuves de distillerie sont généralement ouvertes et l'envahissement par les levures sauvages se fait aisément au détriment des levures pures toujours peu abondantes à cause de leur prix (1).

Ces levures de vin présentent cependant l'avantage d'être toujours identiques à elles-mêmes, puisqu'elles sont toujours fabriquées de la même façon.

Delbruck a sélectionné des levures pures provenant des moûts amylacés.

Ici, les résultats n'ont pas lieu d'être mauvais car les levures n'ont pas à souffrir du changement de milieu. On préconise l'emploi de cette levure sélectionnée pour les moûts pour lesquels elle a été créée, c'est-à-dire pour les moûts amylacés très concentrés.

Différents bactériologues, entre autres Fernbach, ont sélectionné des levures en vue du travail des mélasses, les résultats pratiques ne sont pas encore bien connus, mais il est probable qu'ils seront satisfaisants.

Achat de levures pures. — Quand on achète des le-

(1) Récemment M. Barbet en faisant fermenter des levures pures de vin dans un moût formé de vinasses de cognac et de glucose a obtenu des eaux-de-vie rappelant les véritables.

vures pures on doit constater que le vase est resté convenablement fermé.

Les levures pures de vin se vendent ordinairement à l'état de bouillons de culture placés dans des touries fermées par un bouchon percé d'un trou et laissant passer un tube de verre oblitéré par du coton. On doit constater que le coton est resté en place.

Les levures pures pour moûts épais sont vendues par 5 kilogrammes, en boîtes de conserve non soudées. On doit vérifier qu'elles ne sont pas ouvertes.

Enfin, certaines levures sont vendues en boîtes soudées. Il suffit de vérifier l'état des soudures.

La levure pure reçue, il n'y a qu'à l'employer suivant les indications relatives à l'espèce et au mode de culture.

Il est bon cependant d'en vérifier de temps en temps la force fermentescible.

MULTIPLICATION DE LA LEVURE A L'INTÉRIEUR DES DISTILLERIES

La multiplication de la levure pour le service d'une distillerie comporte deux sortes d'opérations distinctes et d'ailleurs d'inégales fréquences.

Une de ces séries consiste à produire dans l'usine même, au lieu de l'acheter, le premier stock de levure nécessaire pour le fonctionnement des fermentations.

C'est donc tout un travail qui peut ne pas être exécuté si on achète de la levure.

Une autre série d'opérations consiste à multiplier le premier stock, tout en l'acclimatant au travail pour lequel il est destiné ; c'est ce que l'on appelle, suivants les cas, faire un levain ou un pied de cuve, ou dans le sens général du mot, faire un levain. Cette opération est nécessaire, que l'on ait acheté ou produit soi-même le stock de levure.

Il y a donc lieu de subdiviser ce chapitre en deux

parties, la 1re s'occupant à proprement parler de la multiplication des cellules pour le 1er stock, la 2e s'occupant des levains.

En fait, il n'y a lieu que de s'occuper de la multiplication d'une levure de brasserie ordinaire et de celle d'une levure pure.

Formation du premier stock.

Multiplication d'une levure de bière ordinaire. — Elle n'a plus guère de raison d'être car il est aussi facile de multiplier des levures sélectionnées.

On fait une sorte de brassin. La bière qui en résulte est mélangée au moût à distiller pour récupérer l'alcool et la levure est recueillie. Pour fabriquer ce brassin on peut employer 25 kilogrammes de malt ou 20 kilogrammes de malt et 5 kilogrammes de seigle par hectolitre de moût. D'autre part, on fait une décoction de 250 grammes de houblon dans 10 litres d'eau qu'on mélange au brassin et l'on ramène le tout à 25° environ. On ajoute alors 1 litre de levure de bière. Après une fermentation de 10 heures, on perce le chapeau qui s'est formé à la surface du brassin en plongeant isolément les deux mains dans le brassin, les joignant sous le chapeau et en les soulevant de manière à percer celui-ci, on recueille alors la levure qui monte à la surface ainsi découverte à l'aide d'une sorte de pelle plate dite écumoir. La méthode est assez pénible et ne donne que 5 litres environ d'une levure isolée.

Multiplication des levures pures. — Les levures pures sont toujours dispendieuses, car elles coûtent cher de prix d'achat (1) et de plus lorsqu'elles sont livrées en

(1) La levure Delbruc vaut 6 fr. 25 le kilogramme; quant à la levure de vin il faut compter qu'on en emploie 5 fois plus que de levure de bière et 10 fois plus que de levure pressée.

bouillon de culture comme les levures de vin, elles sont très affaiblies. En effet, elles sont vieilles de par leur mode de livraison, elles sont cultivées en milieu aéré, ce qui tend à les affaiblir ; il est vrai que cette tendance est combattue par la basse température de leur production, mais celle-ci a pour effet de les enrichir en azote, ce qui, à la vérité, relève leur pouvoir ferment mais les rend paresseuses.

Il y a donc tout intérêt à reproduire la levure par soi-même.

Deux cas sont à considérer :

Ou bien on sélectionne soi-même la race,

Ou bien on en achète la première amorce.

Sélection. — La sélection se fait par une des méthodes indiquées dans la 1re partie ; au début, c'était la méthode Pasteur qui était seule employée, aujourd'hui on donne surtout la préférence à la méthode des gouttelettes en milieu solide.

Multiplication. — La multiplication proprement dite se fait par une série de cultures successives dans des appareils de plus en plus grands.

Appareil Pasteur. — Pasteur, qui dans sa cuvette photographique avait déjà beaucoup de levure, se contentait d'une seule multiplication.

Il la faisait dans un appareil composé d'une chaudière cylindrique fermée par un couvercle conique à joint hydraulique ; latéralement se trouve une tubulure d'ensemencement fermée par un caoutchouc et un bout de baguette de verre ; le couvercle conique porte un tube abducteur envoyant le gaz carbonique dans un vase d'eau. De plus, l'appareil est disposé pour être refroidi par une pluie d'eau tombant sur le couvercle conique, débordant des joints sur la paroi cylindrique et recueillie dans une bassine pour ne pas faire de gâchis.

L'appareil est rempli de moût de bière bouillant, on

le ferme et on le refroidit à 28°-30° par la pluie d'eau, on l'ensemence par la tubulure latérale et lorsque la densité du moût est tombée de moitié, on utilise la levure. Il faut tâtonner pour savoir la durée de l'opération.

Autres appareils. — Lorsqu'on emploie la sélection par cultures sur gélatine, on fait d'abord trois cultures, une dans un vase de 250 centimètres cubes, une dans un vase de 500 centimètres cubes et une dans un vase de 1 500 centimètres cubes.

En général, le liquide de ce dernier vase est assez abondant pour mettre en route les appareils proprement dits de multiplication, lorsque ceux-ci comportent un vase à levure mère où se fait une 4e culture.

Si l'appareil de multiplication ne comporte pas de vase à levure mère, on fait alors une 4e culture dans un vase de 4 litres (fig. 79). Ce vase est ordinairement un bidon à tube abducteur et à tube latéral d'ensemencement, il est quelquefois en nickel, d'autres fois en cuivre étamé.

Après ces trois ou quatre cultures, on en fait une dans un appareil spécial de plus grande capacité.

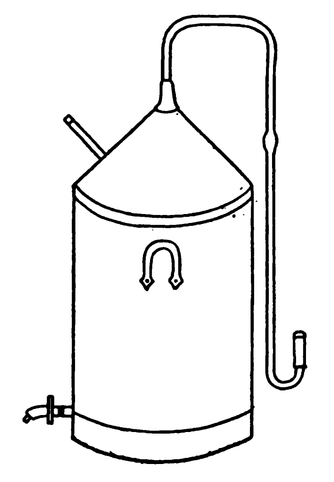


Fig. 79. — Vase à culture en grand de Hansen. D'après Jorgensen.

Pour les usages de la brasserie on a créé des appareils donnant en définitive peu de levure mère.

Tous ces appareils sont stérilisables par la vapeur, ils comportent ordinairement un système d'agitation soit mécanique, soit par injection d'air; on peut de plus y aérer les moûts.

Je ne ferai qu'indiquer le principe de quelques-uns de ces appareils.

Appareil Hansen-Kuhle (fig. 80). — L'appareil Hansen-Kuhle comporte un réservoir à air à 4 atmosphères alimenté par une pompe ; ce réservoir peut envoyer à volonté de l'air : α) ou bien au-dessus d'un réservoir à moût qui est en charge sur la cuve de fermentation, β) ou bien au-dessus de celle-ci, γ) ou bien au-dessous.

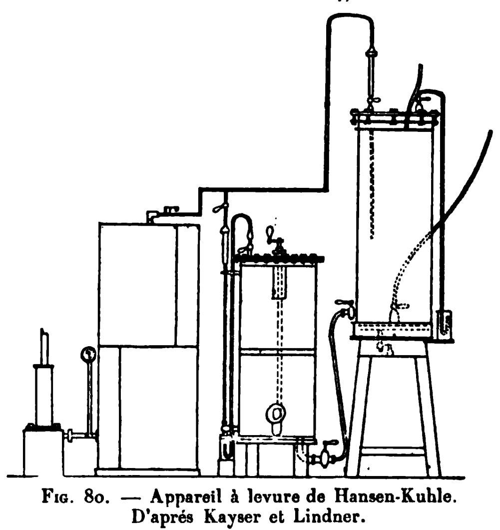


Fig. 80. — Appareil à levure de Hansen-Kuhle. D'après Kayser et Lindner.

Le réservoir à moût communique avec le bas de la cuve de fermentation.

A l'aide de l'air, on peut donc pousser le moût du réservoir dans la cuve, ou chasser le moût de celle-ci, ou aérer par barbottage cette dernière.

Un système d'agitation mécanique permet de mêler à un résidu de fermentation du moût nouveau, de sorte que l'appareil une fois amorcé peut marcher perpétuellement.

Cet appareil peut fournir tous les 4 jours 54 litres d'une bière en fermentation capable d'amorcer 8 hectolitres. C'est l'équivalent de 4 litres de levure ordinaire.

Appareil Jorgensen-Bergh (fig. 81). — L'appareil de Jorgensen et Bergh est une modification du précédent. Il comporte comme particularité un réservoir à moût qui sert également de cuve de fermentation et qui est enveloppé en bas d'une double enveloppe à vapeur et en haut d'une double enveloppe à eau de réfrigération.

Ce réservoir à moût est placé au-dessous d'un vase à culture qui est alimenté de moût lorsque cela est nécessaire en faisant remonter par la pression d'air du moût venant du réservoir à moût placé en dessous.

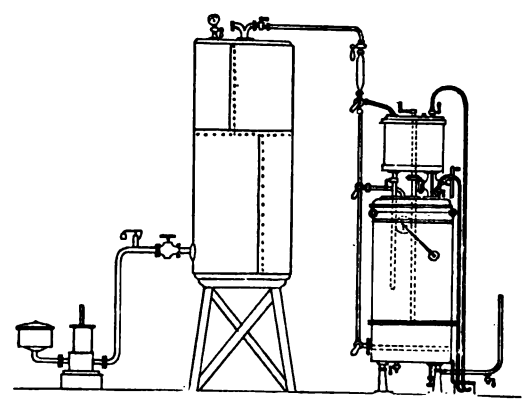


Fig. 81. — Appareil à levure de Jorgensen-Bergh. D'après Jorgensen et Kayser.

Appareil Marx (fig. 82). — L'appareil Marx est également formé d'un vase à culture et d'un réservoir à moût.

Le 1er contient un serpentin mobile qui peut servir à stériliser, à refroidir, à agiter.

Le 2e contient un barbotteur d'air.

Appareil Lindner (fig. 83). — L'appareil Lindner est essentiellement formé d'un vase à culture d'une cinquantaine de litres. Ce vase est cylindrique à axe horizontal et peut tourner autour de cet axe.

Il porte une tubulure qui ne plonge pas et une autre opposée à la première qui est continuée à l'intérieur

jusqu'auprès de la paroi opposée par un tube percé de petits trous.

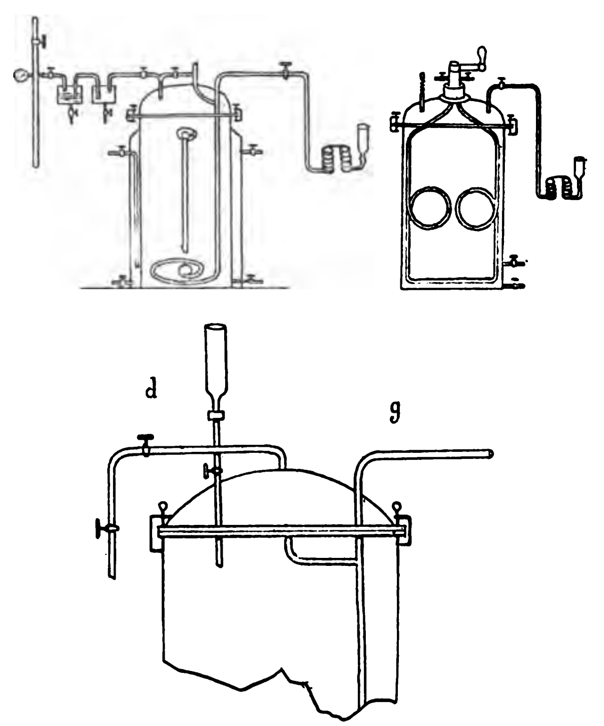


Fig. 82. — Appareil à levure de Marx. D'après Kayser.

Cet appareil peut être mis en communication par des

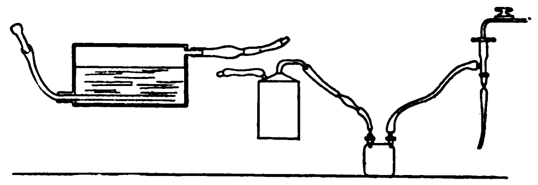


Fig. 83. — Appareil à culture de Lindner. D'après Lindner.

caoutchoucs : 1° avec le réservoir à moût ; 2° avec une

série formée : *a*) du vase à levure mère (5 ou 6 litres équivalent à 50 ou 60 grammes de levure pressée) ; *b*) d'un vase de sûreté ; *c*) d'une trompe à vide.

Pour remplir l'appareil, on le met en communication avec le réservoir à moût par le tube qui ne plonge pas. Pour le stériliser, on l'isole et on le fait tourner autour de son axe. Cela fait, on porte à l'ébullition le liquide à l'aide d'un fourneau spécial, ce qui le stérilise ainsi que la tubulure plongeante par laquelle sort la vapeur.

On adapte alors un filtre à air (coton stérilisé) sur cette tubulure, on tourne à nouveau l'appareil de manière à replacer la tubulure qui ne plonge pas à la partie supérieure pour la stériliser à son tour.

Cela fait, on attelle par la tubulure qui ne plonge pas le vase à culture à la série des flacons ; on ouvre l'eau de la trompe de sorte qu'on fait barbotter de l'air dans le moût, ce qui le refroidit.

Lorsque le refroidissement est obtenu, on arrête l'air, on tourne un instant le cylindre, de manière à ramener la tubulure qui ne plonge pas en bas; cela permet de faire tomber un litre de moût dans le vase à levure pour en diluer le contenu par agitation. On fait repasser ce contenu dans le vase à culture, on ouvre la circulation d'air, et au bout d'un certain temps, on renvoie 5 ou 6 litres de liquide dans le vase à levure, cela servira à l'amorçage d'une opération ultérieure.

Toutes ces opérations s'exécutent en prenant les précautions d'asepsie indispensables.

En 5-6 jours on a 50 litres d'un liquide suffisant pour ensemencer 2,5 à 3 hectolitres, c'est l'équivalent d'environ 1 litre ou 2 de levure ordinaire de brasserie.

Cet appareil n'est pas continu.

Appareil Fernbach (fig. 84). — L'appareil Fernbach diffère de l'appareil Hansen en ce que l'agitation est produite par l'air.

Cet appareil se compose :

a) D'un stérilisateur disposé pour faire bouillir le moût, le faire refroidir par une pluie d'eau et pour le laisser siphonner dans le vase à culture ;

b) Du vase de culture disposé de manière :

1° A stériliser la 1re charge de liquide et à la refroidir;

2° A recevoir le liquide stérilisé venant du stérilisateur pour les charges suivantes.

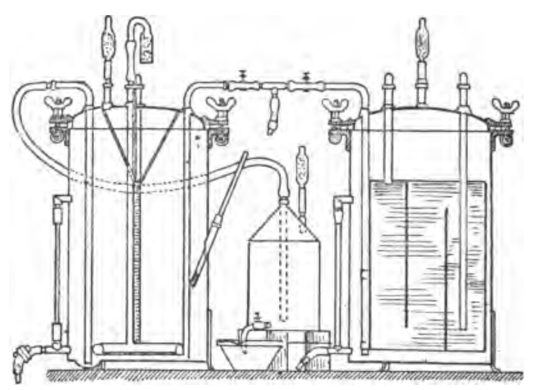


Fig. 84. — Appareil à culture de Fernbach. D'après Jorgensen et Kayser.

Il suffit de faire le vide par la partie supérieure de l'appareil pour que le passage ait lieu.

3° A laisser rentrer de l'air pour produire l'aération et le barbottage ;

La rentrée d'air est constituée par un tube amenant de l'air filtré dans une boîte plate située au fond de l'appareil et percée à la partie supérieure de petits trous ;

L'appel d'air est fait à la partie supérieure de l'appareil par la trompe ;

4° A siphonner la partie la plus limpide du moût de culture ;

5° A faire passer le reste dans un vase collecteur où le dépôt s'achève et où on le soutire.

Tous les tubes peuvent être stérilisés à la vapeur.

Tous les appareils qui viennent d'être décrits sont utilisés surtout en brasserie et on y place ordinairement comme milieu de culture du moût de bière ordinaire.

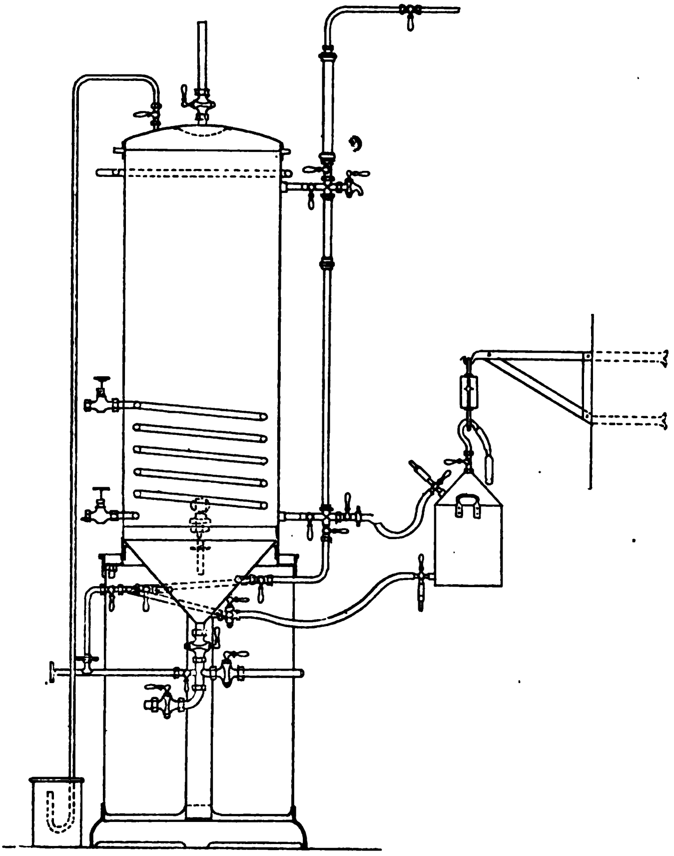


Fig. 85. — Appareil à culture de Pest. D'après Marcker.

Ils servent le plus souvent à multiplier des levures sélectionnées à l'usine même.

Appareil Pest (fig. 85). — En distillerie on emploie souvent un appareil différent. L'appareil de Pest qui est

capable d'amorcer 50 hectolitres de moût, en partant de $2^{kgr},5$ de levure pressée ou de 5 kilogrammes de levure ordinaire.

Cette levure pressée est généralement la levure sélectionnée de Berlin.

On peut utiliser l'appareil pour multiplier une levure pure quelconque, mais il faut remarquer que les appareils de culture tels que celui de Hansen ne donnent pas en une seule opération la charge suffisante pour l'appareil de Pest, car ces appareils donnent l'équivalent de 4 litres de levure de brasserie.

Description de l'appareil. — C'est une sorte d'autoclave cylindro-conique où la stérilisation peut être obtenue par la vapeur et où l'agitation est due à l'air.

1° Il contient un serpentin intérieur où l'on peut à volonté envoyer de l'eau pour refroidir ou de la vapeur pour stériliser;

2° Il porte un tube abducteur pour l'acide carbonique ;

3° Il est muni latéralement d'un tube de niveau qui est relié : *a*) par l'intermédiaire d'un filtre avec une pompe à air de sorte que l'on peut suivant les cas aérer par le haut et le bas de l'appareil puisque le tube de niveau est fixé sur celui-ci en haut et en bas ; *b*) à hauteur du niveau supérieur de l'appareil, par un tube de caoutchouc, à la partie supérieure du vase à levure; *c*) par la partie inférieure à un robinet à trois voies, dont :

α) Une voie permet de mettre le tube de niveau en communication avec un tube faisant le tour du fond de l'appareil et ayant trois dérivations tangentielles vers l'appareil.

Ce dispositif permet de produire avec l'air, au fond de l'appareil, un mouvement de giration du liquide.

β) Une voie permet d'envoyer de l'air dans le tube de descente de la levure, tube qui vient du fond du vase à levure et se dirige vers le fond de l'appareil de culture.

γ) Une voie permet le passage de la levure dans ce dernier tube ;

4° La partie conique porte au sommet 4 robinets en croix :

α) Un amène la vapeur de stérilisation ;

β) Un amène le moût venant d'un stérilisateur ;

γ) Un sert à décanter ;

δ) Un sert à vider l'appareil.

5° A une certaine hauteur une autre vidange ;

6° Une pomme d'arrosoir intérieure permet de nettoyer l'appareil ;

7° Un vase à levure qui peut être relié par en haut au tube de niveau, qui sert de conduite d'air et qui est relié par en bas au fond de l'autoclave.

Lorsque la liaison supérieure n'existe pas, l'appareil est fermé par un bouchon.

Ce vase à levure est souvent suspendu à une balance de manière à indiquer le poids de levure mère.

Marche de l'appareil. — A. Stérilisation du tube à moût, de l'autoclave, de toutes les tubulures et du vase à levure s'il n'est pas chargé. — Pour ce faire on lâche la vapeur, en ouvrant et fermant successivement les robinets convenables pour l'envoyer dans toutes les parties de l'appareil.

Si l'appareil à levure est chargé, il est isolé par en haut et fermé.

B. Aération. — On envoie de l'air tout en continuant à envoyer la vapeur mais en la diminuant peu à peu.

Si le vase à levure est isolé, l'air passe par le tube de niveau et de là dans l'appareil par les 3 communications qui existent entre lui et le tube de niveau.

Si le vase à levure n'est pas chargé, l'air est détourné pour passer dans ce vase, il n'entre alors dans l'appareil que par la communication du haut et celle du bas.

C. On isole le vase à levure s'il y a lieu.

D. On purge l'eau de condensation. — Pour cela on

aère par le haut de manière à faire pression et on ouvre le robinet de décantation et celui de vidange.

E. On remplit alors de moût, en ouvrant le réservoir, le robinet à moût et le tube abducteur de dégagement des gaz. On réchauffe ce moût ou on le refroidit suivant le cas avec le réfrigérant interne.

F. On aère le moût en dirigeant l'air par le tube contournant l'appareil.

G. Le liquide se trouble, on décante alors ; pour cela on rend l'air par le haut pour laisser le liquide en repos, on ouvre le robinet de décantation, on le ferme, on ouvre le robinet de vidange, on le referme.

H. On règle la température à l'aide du serpentin tout en aérant par le bas.

I. Si le vase à levure n'est pas chargé on le charge par la partie supérieure.

J. Pour ensemencer le vase à culture on dirige l'air vers la partie supérieure du vase à levure, et on ouvre la communication de celui-ci avec le bas de l'appareil à culture ; l'air fait passer la levure.

H. Au début de la fermentation on aère légèrement par le bas.

K. Quand la fermentation est terminée, on vidange en envoyant l'air par le haut de l'appareil, et en ouvrant la vidange supérieure.

Lorsque le niveau est descendu trop bas on ferme celle-ci et ouvrant la communication avec le vase à levure mère on le remplit.

On referme cette communication et on achève la vidange en ouvrant le robinet de vidange inférieur.

L. On lave l'appareil.

M. On recommence s'il y a lieu.

On charge l'appareil de moût de bière à 14° Balling et on pousse la fermentation jusqu'à la chute 1°-1°,5 Balling.

Si on doit utiliser de suite la levure on emploie le bouillon tel quel.

Remarque. — A l'institut de Berlin, on se sert du contenu de l'appareil pour amorcer un levain de 50 hectolitres fait avec 500 kilogrammes de malt sec d'après le procédé moderne de fabrication, mais en ayant soin d'aérer.

Lorsque la chute à 1°,5 Balling est atteinte, on turbine et l'on met en boîte pour la vente.

Mais ce sujet sort du cadre de ce livre, car c'est une véritable opération de technique. Nous la retrouverons ailleurs.

Arrivons maintenant à l'étude des levains.

Levains.

Définition. — Dans le sens le plus général du mot un levain est un milieu où la levure doit se multiplier et s'acclimater.

Dans un sens restreint le mot levain signifie un pareil milieu fait d'éléments différents de celui du moût à faire fermenter; on oppose à ce mot, celui de pied de cuve qui signifie un moût fait du moût lui-même.

Le caractère de pareilles cultures est non seulement de produire beaucoup de cellules, mais de donner une population adulte ayant achevé sa croissance sans avoir cependant commencé la fermentation, qui ne doit avoir lieu qu'aux dépens du moût proprement dit.

Dans ces cultures, le dégagement de gaz carbonique doit encore être faible ainsi que la proportion d'alcool produit. Ce dernier point est indispensable :

1° Parce que c'est une preuve que la fermentation n'a pas commencé ;

2° Parce qu'une teneur en alcool supérieure à 5 pour 100 diminue le pouvoir ferment des levures même jeunes, même n'ayant pas fermenté par elles-mêmes.

Période d'accroissement. — Le temps nécessaire pour réaliser la multiplication maxima est la période d'accroissement : α) elle est d'autant plus courte que l'on a ensemencé plus fortement, car dès que les individus sont en nombre déterminé ils se gênent mutuellement et la fermentation commence ; β) cette période d'accroissement est encore d'autant plus courte que la température a été au début plus élevée. Il semblerait donc qu'on aurait intérêt à élever la température. Mais il faut remarquer que si en élevant la température on diminue la période d'accroissement, en avançant la fin de cette période, en même temps on avance le commencement de la période de fermentation.

Or, si on élève trop la température l'avance donnée au début de la période de fermentation peut être plus grande que l'avance de la fin de la période d'accroissement, de sorte que la période de fermentation peut arriver à empiéter sur la période d'accroissement, et dans ce cas, il y aura beaucoup de cellules faisant fermenter avant que toutes les cellules soient produites. Il résulte de cela que : 1° la multiplication sera gênée et que 2° les cellules faisant fermenter le levain auront dans le moût une période d'activité plus courte.

On a intérêt à avoir une période de multiplication courte, mais il faut néanmoins que le nombre des cellules soit suffisant.

Degré de multiplication. — On peut se demander quel est le degré de multiplication que l'on peut obtenir dans un levain. Il n'est pas très grand. Dans un levain riche (comme celui à base de malt) il n'est que de 4 ou 5 (1) ; dans un pied de cuve de betteraves il n'est que de 2 ou 3.

---

(1) On estime que dans une fermentation amylacée en moût concentré la multiplication est de 13 ou 14, elle est plus grande parce que la durée est plus grande que celle de la préparation d'un levain.

Ce degré de multiplication dépend : 1° de la nature du moût quant à sa nature elle-même, à sa concentration en sucre, à sa teneur en azote ; 2° de sa température ; 3° de l'aération.

Nous allons passer ces différentes influences en revue :

Influence du moût sur le degré de multiplication. — *a*) **Effet de la concentration.** — A part une très forte concentration en sucre une concentration quelconque n'a par elle-même aucune influence sur la quantité de levure formée et si l'on fait des moûts levains concentrés (1), c'est : α) pour qu'ils soient épais, et qu'ils donnent facilement un chapeau protecteur de la levure contre les microbes ; β) pour que leur constitution se rapproche de celle des moûts à fermenter, ce qui est important au point de vue de l'acclimatation ; γ) pour qu'ils fournissent une dose d'alcool protectrice tout en contenant encore beaucoup de maltose.

b) **Influence de l'azote du levain.** — Mais ce qui intervient c'est une certaine corrélation nécessaire entre le sucre du moût levain, l'azote de la levure mère et la température adoptée.

Le pouvoir d'accroissement d'une levure mère augmente en effet avec sa richesse en azote jusqu'à une certaine limite qui dépend du sucre et de la température du moût-levain.

Pour chaque richesse en sucre d'un moût-levain à une température déterminée, il y a une dose d'azote de la levure mère pour laquelle le pouvoir d'accroissement est maximum.

Donc un moût-levain bien proportionné pourra donner de meilleurs résultats qu'un moût-levain très riche en

---

(1) Autrefois les moûts de malt et de pomme de terre marquaient de 14 à 18° Balling, aujourd'hui ils marquent 6° de plus.

sucre mais pour lequel la corrélation avec la température et l'azote de la levure mère n'existe pas.

Il faut remarquer que dans ce moût-levain bien proportionné, où nous avons mis notre levure mère, nous allons obtenir une levure fille d'une certaine richesse en azote ; or cette levure fille doit être mise dans le moût proprement dit où elle doit sans doute se multiplier à son tour, mais surtout provoquer la fermentation. Son azote doit donc plutôt que d'être en corrélation avec le sucre du moût être tel qu'il y ait fermentation active. Or une levure possède d'autant plus la propriété de faire fermenter qu'elle est plus riche en azote. Donc la levure fille du levain doit avoir une teneur maxima en azote. Comment varie l'azote d'une levure fille ? Si le titre du moût-levain en azote est petit, la richesse en azote de cette levure fille est petite et reste constante, de sorte que cette levure fille garde une faible activité constante pour de faibles variations du titre en azote du moût de culture.

Si le titre en azote du moût de culture est égal à 0,2 pour 100, la levure fille prend une richesse en azote proportionnelle à la richesse en azote du moût et d'autant plus grande que la température est plus basse.

Si enfin le titre en azote du moût est égal ou supérieur à 0,5 pour 100, la richesse en azote de la levure fille demeure constante et est maxima (1).

La richesse en azote d'une levure fille dépend donc de la richesse en azote du moût-levain et pour lui donner une richesse en azote maxima, il faut que le moût-levain soit à un titre en azote plus grand que 0,5 pour 100.

Il résulte de ce que nous venons de dire qu'un moût-levain puissant doit avoir son sucre en rapport avec l'azote de la levure mère pour créer le plus grand nom-

(1) Tout cela suppose la richesse saline normale.

bre possible de levures filles et que son propre titre en azote doit être plus grand que 0,5 pour 100 pour fournir des levures filles de grande force fermentescible, mais aussi un peu paresseuses.

Exemples. — Dans le levain de malt vert on met 1 kilogramme de malt vert par litre d'eau, or 1 kilogramme de malt vert contient 1 pour 100 d'azote. Il y a donc $0^{kgr},01$ d'azote dans 2 kilogrammes de levain ; le titre est par conséquent 0,5 pour 100 ; le moût a une richesse en sucre de 20 pour 100.

Dans le cas des betteraves et des mélasses, on évite les levures paresseuses, on préfère aller plus vite, quitte à mettre plus de levure. On ne fera pas de moûts-levains d'un titre égal ou supérieur à 0,5 pour 100. Ainsi on met souvent de la levure à même le moût de betteraves qui n'est qu'au titre de 0,1 pour 100 en azote et pour avoir une levure un peu plus forte, l'on fait un moût-levain pour betteraves en ajoutant à du moût de betteraves 500 grammes de peptone par hectolitre. Cela constitue un moût contenant 0,175 pour 100 d'azote et 7 pour 100 environ de sucre.

Pour les mélasses on fait un levain du même genre en partant d'un moût de densité 1,045 à environ 6 pour 100 de sucre.

Mais on fait souvent pour les mélasses des levains de grains aux acides ; par exemple on traite 100 kilogrammes de grains par 10 kilogrammes d'acide chlorhydrique et 500 litres d'eau ; en comptant l'eau de condensation, cela fait un total d'environ 800 kilogrammes où il y a sensiblement 2 kilogrammes d'azote et 70 kilogrammes de sucre, les titres sont donc 0,25 pour 100 d'azote et 8,7 pour 100 de sucre.

Ce levain donne une levure plus azotée que la précédente et partant plus active.

Ce que nous venons de dire s'applique en réalité à

tous les moûts de culture où l'on veut faire la multiplication de la levure dans le but d'amorcer un autre moût.

Cela s'applique par conséquent à tous les levains dans le sens restreint du mot, aussi bien qu'aux pieds de cuve.

Mais il y a des particularités à signaler :

Cas particulier des levains par levure mère. — Dans le plus grand nombre des cas où l'on emploie des levains, ceux-ci ne sont pas renouvelés de toute pièce pour chaque cuve ; ils sont amorcés avec une fraction d'un levain précédent.

Cela entraîne une conséquence importante.

Naturellement, le premier levain a son sucre en corrélation avec l'azote de la levure mère ; la levure fille a l'azote en corrélation avec l'azote du premier levain.

Mais cette levure fille du premier levain devient à son tour levure mère du deuxième. Son azote de levure fille qui dépend de l'azote du premier levain et de celui de la semence, doit être en corrélation avec le sucre du deuxième levain dont elle est la levure mère.

Ainsi donc le sucre du 1er levain est exclusivement en corrélation avec l'azote de la semence ; tandis que le sucre du 2e levain est en corrélation avec l'azote de la levure produite dans le premier levain, c'est-à-dire avec l'azote de ce premier levain et celui de la semence. De même, le sucre du 3e levain est en corrélation avec l'azote du 2e et ainsi de suite.

En fait dans le cours du travail, lorsque le régime est établi, le levain a toujours la même composition.

Il en résulte qu'il doit y avoir corrélation entre l'azote et le sucre d'un levain *reproduit par levure mère.*

Cela ne l'empêche pas d'être constitué pour agir sur le moût lui-même, c'est-à-dire de contenir plus de 0,5 pour 100 d'azote si on veut une levure forte mais un peu lente (ce qui vise à l'économie de levure) ou dans le voisinage de 0,2 pour 100 si on veut une levure moins

active mais moins paresseuse (ce qui vise à l'économie de temps).

Exemples. — Prenons quelques exemples.

Dans le levain de malt vert, 1 kilogramme de malt vert est mêlé à 1 kilogramme d'eau.

On a donc dans 1 kilogramme de levure $0^{kgr},005$ d'azote, $0^{kgr},20$ de matières saccharifiables.

d'où rapport $\frac{\text{azote}}{\text{matières saccharifiables}} = \frac{5}{200} = 0,025.$

Dans le levain Brauer qui sert également pour les pommes de terre on a :

50 litres de moût sucré { représentant 50 kgr. de pommes de terre à 18 o/o de fécule et à 0,4 o/o en azote.
$2^k,5$ de malt vert à 40 o/o de matières saccharifiables et 1 o/o d'azote.
12 litres d'eau.
5 litres de moût acidifié (ayant la composition du reste).

Dans 64,5 kilogrammes environ de moût levain avant l'addition du moût acide on a :

Azote.. . . . . . $0^k,2 + 0^k,025 = 0^k,225$.
Matières saccharifiables $9^k + 2,5 \times 0,4 = 10^k$.
Matières saccharifiées $11^k,1$.

Ce qui fait un rapport de $\frac{0,225}{11,1} = 0,0203.$

Le levain peptonisé pour betteraves dont nous avons parlé plus haut présente un rapport analogue.

On a en effet $\frac{\text{azote}}{\text{sucre}} = \frac{0,175}{7} = 0,025.$

Le levain de grains signalé pour les mélasses a un rapport de $\frac{0,25}{8,7} = 0,028$. Ce rapport est plus grand que 0,025. Or on ne coupe pas en général ces levains ; on les refait de toutes pièces.

Il semble donc que l'on puisse énoncer la loi suivante :

Un levain peut se renouveler par levure mère, si le

rapport de l'azote au sucre de ce levain n'est pas supérieur à 0,025.

Remarque sur les premiers levains. — Nous avons vu que le premier levain devait avoir son sucre en corrélation avec l'azote de la semence. La levure issue de cette culture prend une dose d'azote qui dépend de l'azote du 1er levain et qui en général est différente de l'azote de la semence.

Cette levure est mise dans un 2e levain et son azote va être influencé par l'azote de ce 2e levain, etc.

On conçoit qu'après quelques cultures appropriées, l'azote d'une n^e levure soit tel que celle-ci mise dans le $(n + 1)^e$ levain garde sa teneur en azote. A partir de ce moment en employant toujours le même moût bien constitué à la même température on aura toujours la même levure.

Il n'en est pas moins vrai qu'au début on est amené à modifier la teneur en azote de la levure semence. Donc au début on doit employer des moûts levains spéciaux.

En fait il s'agit soit de remonter en azote la levure semence, soit de l'abaisser.

Relever le titre est le plus fréquent; pour ce faire le premier levain sera riche en azote, on le cultivera à une température un peu basse. De plus un ensemencement très fort (1/10) ou très faible (1/1000) est favorable. Ces deux manières de faire s'expliquent.

Dans le premier cas, une grande quantité de levure n'ayant que peu de sucre tend à assimiler l'azote; dans le 2e cas, une petite quantité de levure ayant à sa disposition un excès d'aliments se gave pour ainsi dire de tout et en particulier d'azote.

Lorsqu'il faut abaisser le titre d'une levure en azote, on peut employer le procédé inverse d'un ensemencement moyen (1/100), dans un milieu pauvre en azote et à température élevée. La prolifération est moyenne et comme il y a peu d'azote à partager, chaque levure en a peu.

Cas particulier des pieds de cuve. — Un pied est un levain fait du moût lui-même.

On emploie à cet effet une couche de 30[c] à 40[c] de moût à laquelle on mélange la levure à employer.

Il y a lieu de se demander pourquoi dans ce cas on met la levure dans une partie du moût seulement et non dans la totalité puisqu'on doit par la suite ajouter le reste. Lorsqu'on veut faire une multiplication de cellules il faut aérer le moût; plus celui-ci est en couche épaisse, plus l'aération est difficile parce que l'air n'agit qu'à la surface et parce que le gaz carbonique a plus de mal à se dégager. C'est pourquoi l'on commence par ajouter à la levure une faible couche de moût où l'aération est plus facile, et où, par conséquent la multiplication et l'acclimatation se font plus rapidement.

Cette manière de faire a encore un avantage, on peut employer un liquide plus chaud, qui diminue comme on sait la période d'accroissement; l'augmentation de température du pied répartie ensuite sur la masse totale du moût est peu importante et n'intervient presque pas dans la fermentation. Il en serait tout autrement si on chauffait la totalité de la masse à la même température que le pied de cuve. On aurait à craindre des débordements, c'est-à-dire qu'on serait obligé de laisser un grand vide dans les cuves; de plus on aurait à craindre l'involution des levures.

Appliquons les principes généraux des levains au cas des pieds de cuves.

Constitution des pieds de cuve. — Il est évident, dans ce cas, que l'azote de la levure semence doit être en rapport avec le sucre du moût lui-même. On obtient une levure fille dont l'azote dépend de l'azote du moût. Ceci n'a d'autre intérêt, lorsque l'on fait un pied par cuve, que l'activité de la levure; mais en général on combine la méthode des pieds de cuve avec celle du coupage

des cuves, c'est-à-dire qu'on amorce la $(n+1)^e$ cuve avec un morceau de la n^e. Dans ce cas la levure fille de la première cuve va être versée dans une 2° portion de moût, donc son azote et par suite celui du moût lui-même doivent être en corrélation avec le sucre du moût. Ce qui revient à dire que dans celui-ci le sucre doit être en corrélation avec l'azote; étant données les variations des matières premières cela ne doit pas être souvent réalisé.

Exemples. — La méthode par pied et coupage réussit assez bien avec les betteraves.

Dans le travail à l'eau le rapport azote à sucre est celui de l'azote soluble au sucre inverti de la betterave, c'est sensiblement $\frac{0,15}{12,5} = 0,012$.

Mais dans le travail à la vinasse ce rapport est plus grand.

Dans un moût de pommes de terre formé pour 1 000 litres de

900 kgr. de pommes de terre à 18 o/o de fécule = 142^k de fécule
et de 36 kgr. de malt vert à 40 o/o de fécule = 14,4 d'amidon.

contenant par conséquent 156,4 kilogrammes de fécule équivalente à $173^{kgr},8$ de glucose il y a

$$900 \times 0,022 + 36 \times 0,065 = 19,8 + 2,4 = 22,2 \text{ de matières azotées.}$$

ou $3^{kgr},4$ d'azote.

Le rapport est donc ici de $\frac{3,4}{173,8} = 0,02$.

Les pieds de cuve réussissent également bien avec les mélasses.

Le rapport de l'azote dans un moût de mélasse au sucre inverti est sensiblement le rapport azote total à sucre inverti dans les mélasses elles-mêmes, car le dénitrage enlève peu d'azote; c'est 0,028.

Est-ce parce que ce rapport est plus grand que 0,025

qu'on ne peut couper les mélasses amorcées à l'aide d'un pied? Il serait téméraire de l'avancer.

Toujours est-il qu'on peut couper les betteraves et les pommes de terre amorcées par un pied et chez lesquelles le rapport est inférieur à 0,025 et qu'on ne coupe pas toujours les moûts des grains aux acides qui ont le rapport 0,018 et qu'on ne coupe jamais ceux des mélasses où le rapport est également supérieur à 0,025.

Pour les pommes de terre, on effectuait autrefois le coupage en France où la fermentation se faisait en moût très dilué.

Aujourd'hui en Allemagne, principal pays de l'alcool de pommes de terre, on n'effectue plus le coupage, mais c'est surtout pour des motifs fiscaux.

On opère en moûts très épais, dans un temps déterminé, et l'on doit avoir une levure assez active pour en économiser le plus possible. Or les moûts de pomme de terre ne contiennent que 0,35 pour 100 d'azote, ils ne donneraient pas une levure aussi active que les levains.

De plus les moûts sont tellement épais que les coupages seraient pour ainsi dire matériellement impossibles.

Enfin, il est bon que les cuves aient un chapeau de drèche; or en soutirant, par la partie inférieure, du moût dans une cuve, pour en garnir une deuxième, on ne partagera pas les éléments du chapeau qui restent à la partie supérieure de la cuve soutirée.

Remarque. — A supposer, une fois le régime établi, que la bonne corrélation de l'azote et du sucre existe dans un moût que l'on va couper, on va produire une levure constante et d'activité déterminée. Mais, à moins que la levure de semence soit identique à cette levure du moût, il est évident que l'azote de la levure semence ne cadrera pas avec le sucre du moût, de sorte qu'au début la levure obtenue dans le 1er pied n'aura pas toute l'activité voulue;

la levure de la 1re cuve ne sera pas parfaite et n'étant pas parfaite elle ne cadrera pas non plus absolument avec le sucre du moût, de la 2e cuve, mais elle sera moins éloignée de la perfection que la levure semence. On comprend que peu à peu, à la suite d'un certain nombre de coupages, la levure prendra la composition azotée convenant au sucre du moût. Tout le monde sait que les fermentations par coupage sont plus lentes les premiers jours. C'est pour la raison que nous venons d'indiquer.

Influence de la température sur la multiplication de la levure dans un moût de culture. — Le pouvoir d'accroissement qui dépend du rapport $\frac{\text{sucre du moût}}{\text{azote de la levure}}$ est influencé par la température.

Pedersen a constaté que le 1er jour le maximum d'accroissement a lieu à 30°, et que le 2e jour le maximum d'accroissement a lieu à 13°. Après 8 jours l'accroissement total est le même, quelle que soit la température. La haute température donne donc à l'accroissement une avance qui se perd par la suite; mais avec des levains fermentant en 4-6 heures ou en 10-12 heures, c'est-à-dire en moins de 24 heures comme c'est l'habitude, les hautes températures sont avantageuses.

Influence de l'aération sur la multiplication. — L'aération augmente la multiplication des levures, c'est pour cela : 1° qu'on met les levains dans de grands vases ouverts, à moins que l'on ne craigne les contaminations ; 2° qu'on aère les levains (air stérilisé par filtration au coton salicylé ou par barbottage dans l'acide sulfurique au 1/5) ; 3° qu'on aère la levure avant de la verser dans un levain ou un pied (tamisages répétés, agitation à l'aide d'un balai, cascades répétées de seaux en seaux).

Particularités de la confection des levures et des pieds de cuve.

Betteraves et mélasses.

Pieds. — Quand on fait pour la betterave ou la mélasse des pieds de cuve formés de moûts et d'une levure, on s'assujettit aux règles suivantes :

1° Le moût employé est d'une densité plus faible que le moût normal.

Ainsi on prendra un moût de densité 1,025, le jus de betteraves ayant 1,035, ou un moût de mélasse de densité 1,04-1,045, le moût de mélasse étant à la densité 1,06 ou 1,07.

La raison de ce fait est dans les conditions de sécrétion de la sucrase. On sait en effet que celle-ci diffuse surtout bien lorsque l'alimentation de la levure vient à manquer ;

2° Le moût employé est moins acidifié que le moût normal pour ne pas changer trop brusquement l'acidité à laquelle la levure de bière est habituée ;

3° On prend pour le pied une température légèrement supérieure à celle du moût véritable (1). Cela a pour effet de compenser le refroidissement qui est relativement actif pour une petite masse de liquide, avant le départ de la fermentation. Cela avance d'ailleurs le départ.

En réalité il ne faut pas que lorsque le pied de cuve commence à travailler que sa température soit trop haute, cela rend la levure moins azotée ;

4° La levure avant d'être incorporée au pied doit être

---

(1) Cette température est d'autant plus élevée que la cuve est plus petite.

diluée dans de l'eau ou du jus très faible de manière à rendre le mélange ultérieur avec le moût du pied plus commode;

5° Cette levure doit être aérée : d'où l'usage de la tamiser un grand nombre de fois ou de la battre dans un baquet avec un balai de bouleau ou de la faire tomber en cascade de seaux à seaux;

6° On utilise le pied de cuve lorsque la période d'accroissement est terminée. On pourrait s'en rendre compte par une série de numération des levures (voir plus loin); mais dans la pratique on prend pour critérium la densité du pied.

Autrefois on attendait que la densité du pied fût réduite à moitié, c'est-à-dire que pour les betteraves on attendait la densité 1,0125 (densité abrégée 1,25) et pour les mélasses on adoptait 1,022.

Aujourd'hui on laisse la densité descendre un peu plus bas; car en définitive il vaut mieux dépasser la fin de la période d'accroissement que de ne pas l'atteindre, puisque dans le 1er cas, on a des cellules légèrement gênées par l'excès d'alcool mais qui se remettront dans un moût non fermenté, et que dans le 2e cas il manque des cellules. Aujourd'hui on laisse descendre la densité à 0,004 (0,4) au-dessus de la densité de chute, de sorte que, pour les betteraves travaillées à l'eau, qui donnent 1,000 de densité de chute, on atteint la densité de 1,004 et que, dans le travail à la vinasse où la chute est à 1,003 ou 1,004, on descend jusqu'à 1,007-1,008 (en abrégé 0,7-0,8).

Pour les mélasses la densité de chute est à peu près le tiers de la densité du moût normal, il en résulte que pour le travail d'une mélasse de densité (1,045) on ira jusqu'à 1,019. En gros 1,02.

Levains. — Lorsqu'on fait pour la betterave ou la mélasse des levains enrichis en azote, on prend les précautions suivantes:

1° Le moût doit être stérilisé. Pour la betterave il ne faut pas insister car on coagule des albuminoïdes (surtout dans le jus de presse);

2° La matière azotée adjuvante doit être stérilisée. Cela se comprend car cette matière azotée nutritive est de par cette propriété un nid à microbes;

3° Il est bon de faire les levains dans des appareils stérilisables. Cette précaution est rarement adoptée;

4° On prend une température de 25°-28° suivant la levure;

5° On emploie une quantité de levure correspondant à 1 pour 100 du sucre à faire fermenter. Si on emploie une levure de brasserie, cela correspond à 2 litres par mètre cube de moût à mettre en fermentation par le levain;

6° Ces levains sont ordinairement reproduits par coupage de moitié, ce qui indique une multiplication par deux des cellules;

7° On fait barboter de l'air, ce qui aide la multiplication;

8° On utilise les levains lorsque leur densité est tombée à moitié. Ici, contrairement à ce qui arrive pour les cuves par pied et par coupage, le milieu plus nutritif active la fin de la période d'accroissement en avançant la période de fermentation.

Quand on fait pour les mélasses des levains par grains cuits aux acides; le moût ainsi produit est très riche en acide. Ainsi on chauffe 100 kilogrammes de grains avec 5 kilogrammes d'acide sulfurique et 500 litres d'eau. Après la condensation on a environ 800 kilogrammes de matière. Donc le titre en acide est de plus de 6 grammes par litre.

On devrait neutraliser, mais en réalité on ne neutralise suffisamment que plus tard en introduisant de la mélasse moins acide que dans le travail habituel.

Il en résulte que ces pieds aux acides sont fort longs

à partir (6 à 10 heures): d'autre part il est impossible de reproduire ces levains par coupage, il faut en faire un pour chaque cuve.

Quand on fait pour les mélasses des levains au malt on procède d'après les principes que nous indiquerons pour le travail des matières amylacées, sauf une différence.

Les levains pour matières amylacées ayant achevé leur évolution ne sont pas mêlés directement au moût, on les mélange seulement avec le double de leur volume de ce moût un peu chaud ; c'est ce qu'on appelle le renforcement; on relève ainsi le titre en azote et en sucre du moût levain affaibli par le développement de la levure et on le rapproche ainsi de celui du moût, de sorte qu'on favorise ainsi le développement de la levure et qu'on l'acclimate.

Quand on travaille en vue de la mélasse, on ne fait pas cette addition, car le moût de mélasse n'est pas à ce moment plus riche en sucre que le moût levain et il est plus pauvre en matières azotées solubles.

Matières amylacées au malt.

Dans le travail des matières amylacées au malt on emploie des levains d'un type particulier sur lesquels il y a un grand nombre d'observations intéressantes à faire.

Nous les ferons à propos du levain le plus employé à l'heure actuelle en Allemagne.

Levain lactique de Brauer. — Dans une cuve de 1 hectolitre, on place 50 litres de moût dépelé et filtré, 2,5 de malt vert (1), 5 litres de moût acidulé à l'acide

(1) Malt vert feutré, lavé. D'une manière générale l'introduction du malt dans une levure est indiquée par la forte proportion d'amides.

lactique, 12 litres de vinasse et $0^l,1$ de bisulfite de chaux. Il s'agit d'un moût filtré grossièrement car il faut avoir de la drèche pour permettre au chapeau de se former et de jouer son rôle protecteur. On abandonne le mélange pendant 4 ou 6 heures à 58° et 60° pour établir une bonne saccharification produisant beaucoup de maltose.

L'acide lactique introduit par le moût acide et par la vinasse joue un rôle protecteur pendant la saccharification. Il en est de même du bisulfite.

Cela fait, on chauffe à 75°, dans le but de stériliser le moût; il est vrai qu'on coagule la diastase mais cela a peu d'importance puisque la saccharification a été prolongée.

Autrefois on faisait un levain avec 20 kilogrammes de malt vert dans 20 litres d'eau et dont le brassage ne durait que peu de temps à 60°; on ne pouvait pas stériliser car la diastase était encore précieuse.

Cette dose de 20 kilogrammes de malt vert se rapportait aux levains à faire pour les moûts à 20-22° Balling. On employait 25 kilogrammes pour les moûts actuels à 25° Balling.

En réalité, les levains anciens marquaient ainsi 14-18° Balling tandis qu'aujourd'hui ils marquent 20-24°.

La seule raison de ce changement est le désir d'avoir à côté de l'alcool produit assez de maltose pour que le mélange du levain et du moût à faire fermenter ne produise pas un changement trop brusque de composition.

Il ne se produit d'ailleurs pas plus de cellules que dans les levains anciens.

Revenons au levain Brauer.

La saccharification produite, on abandonne le mélange à lui-même dans une chambre chaude ; là, sous l'influence du ferment lactique incorporé au levain, une fermentation lactique abondante se produit, et lorsque la

température est redevenue de 50 à 54°, l'acidité exprimée en acide sulfurique est d'environ 2^{gr} à $2^{gr},5$ par litre.

Autrefois, dans l'ancien levain, après la saccharification à 60°, on ramenait rapidement le moût-levain à 50° et on l'abandonnait à lui-même dans une chambre chaude pendant environ 14 heures; la température tombant à 38-40°, il se développait alors une acidité lactique (1) correspondant à 6-7,5 grammes d'acidité sulfurique. On explique cette différence par rapport à la nouvelle méthode en disant que l'acide est moins pur.

Ce travail prolongé d'un moût non aseptique était quelquefois dangereux aux températures comprises entre 50° et 38°.

Ce danger n'existe plus dans la nouvelle méthode qui opère au-dessus de 50°; lorsque l'acidité de 2^{gr}-$2^{gr},5$ du levain Brauer est obtenue, on enfonce un réfrigérant dans la cuve, en ayant soin de prélever dans un seau l'excédent de liquide qui doit tendre à déborder, car il faut que la cuve soit toujours pleine; ce sera sur ce liquide qu'on prélèvera plus tard le moût acide pour une opération ultérieure.

On refroidit brusquement à 31° (en dix minutes).

Ici il y a une différence considérable avec le mode opératoire ancien; autrefois on refroidissait à 16-18° en mettant plusieurs heures, puis le refroidissement obtenu on abandonnait la cuve à elle-même à cette température.

Il y avait là ce qu'on appelait un point mort, c'est-à-dire une période très dangereuse au point de vue des infections, où ni le ferment lactique ni la levure ne tra-

---

(1) Au début de la campagne l'acide lactique manque quelquefois dans l'atmosphère de l'usine; on cherche à le produire en introduisant du vieux fromage dont on frotte les appareils, ou en faisant des cultures répétées sur du moût de malt vert à 50°. Aujourd'hui on emploie surtout une culture pure lactique que l'on se procure dans le commerce.

vaillaient. Cette dernière n'était pas encore à ce moment dans le moût. Cette longue attente avait pour but de permettre, croyait-on, la peptonisation des albuminoïdes. Or, il ne s'en forme pas.

Cette période n'était pas très dangereuse au point de vue des bactéries ; le milieu est trop froid et trop acide pour elles, mais elle est très favorable au développement des levures sauvages.

Le moût étant refroidi à 31°, on l'ensemence avec 3 litres de levure de bière ou 1kg,5 de levure pressée ordinaire ou de l'institut de Berlin, ou avec 10 litres de bouillon de culture de la levure de l'institut de Berlin.

On refroidit à 11-12°. A cette température, la fermentation s'établit sans que les bactéries soient à craindre, et la température remonte à 26-27°. La densité tombe de 19-20° à 3,6° Balling (environ 2 pour 100 de sucre non fermenté).

Autrefois la fermentation du moût levain marquant 17-18° Balling était commencée à la température de 16-18° et achevée lorsque la chute était arrivée à 6 ou 8° Balling (environ 3-3,5 pour 100 du sucre non fermenté).

Il y a là une grande différence dans le mode opératoire. En commençant la fermentation plus bas, on tend à élever le titre en azote de la levure; en prolongeant l'opération on cherche à dépasser la fin de la période d'accroissement de la levure plutôt que de ne pas l'atteindre et cela pour les raisons que nous avons déjà dites.

Mais l'ancienne manière de faire avait été imaginée dans l'idée de ne pas faire plus de 5 pour 100 d'alcool dans le levain, on avait à peu près 3,5. Or, ici, on part d'un moût plus concentré que l'ancien, et on descend plus bas. En réalité, la limite de 5 pour 100 est atteinte.

Pendant cette fermentation le titre acidimétrique s'est relevé de 0gr,2 à 0gr,4 d'acidité tandis que dans l'ancienne manière de faire elle se relevait de 0gr,8 à 1gr,5.

L'odeur du levain doit être franche, non piquante, non nitreuse, non sulfureuse.

Le goût doit être légèrement amer, sans arrière-goût acide.

La levure étant mûre, on en prélève une portion qui doit servir de levure mère pour une opération ultérieure. Pour cela on agite le liquide avec un mouvoir et on prélève environ le tiers du moût.

Cette levure mère doit être conservée au frais, à 10-12°, autant que possible dans un vase refroidi par un courant d'eau.

On a aussi préconisé de mêler cette levure mère avec une partie du moût acide déplacé lors de l'introduction du réfrigérant.

Le reste du levain est alors additionné de 2 fois son volume de moût à 28°, on l'abandonne à lui-même 30 à 60 minutes, jamais plus de deux heures, puis on l'emploie.

Cela constitue l'opération du renforcement qui a pour but d'acclimater la levure au nouveau moût tout en relevant la richesse du moût-levain épuisé. Ce n'est pas d'ailleurs cet enrichissement que l'on cherche ; car si on mettait le levain dans la totalité du moût, il serait encore bien plus enrichi (1).

Il ne faut pas attendre trop longtemps pour employer le levain parce que la fermentation marche toujours, ce qui étiole les levures, et parce que à la température où l'on se trouve, les ferments acétiques sont à craindre.

Remarques. — Dans cette fabrication il y a de nombreuses conditions à réaliser :

(1) Nous avons vu que ces levains peuvent être employés avec les mélasses ; dans ce cas on ne renforce pas, car le moût de mélasses est plus pauvre que le moût levain résiduel, cela affaiblirait la levure ; il est vrai que cela l'acclimaterait.

1° La plus grande propreté : autant que possible on lave le malt ; lorsqu'on agite le moût, on a soin de brosser les parois avec une brosse et de l'eau chaude pour faire retomber les éclaboussures qui, abandonnées à l'air, deviendraient des nids à microbes ;

2° Dans l'ensemencement on doit éviter la couche superficielle de la levure mère formée d'une drèche qui a protégé la levure et qui par suite est infectée de bactéries ;

3° L'acidification à 50° doit être faite dans une chambre aussi chaude que possible, on recommande de l'adosser à la chaufferie, de protéger la cuve par une enveloppe de paille, etc.

4° Le refroidissement de 50 à 30° doit être fait dans le temps le plus court possible, d'où l'emploi de réfrigérants puissants et mobiles qui permettent d'ailleurs un dégagement plus facile du gaz carbonique. On ne doit refroidir que lorsque la levure mère est prête à être employée.

Examen microscopique d'un levain. — Nous avons donné les caractères empiriques de la maturité d'un levain.

Le mieux serait de suivre le développement au microscope. Les cellules jeunes sont très bourgeonnantes, leur protoplasma n'a ni granulations ni vacuoles.

La levure mûre est caractérisée par des cellules isolées, à contenu brillant, avec une seule vacuole.

Une bonne levure ne doit pas contenir de bactéries butyriques.

Mais ce qui est plus intéressant c'est le nombre des cellules vivantes contenues dans le levain.

Numération des cellules. — Voici comment s'effectue la numération :

1° On dilue le moût au 1/10 ou au 1/20 suivant qu'on juge qu'il est plus ou moins riche en cellules (on tâtonne) ;

2° On agite et on prélève une goutte que l'on place dans la chambre d'Hayem.

Cet appareil comprend une chambre humide, creuse de $0^m,1$, recouvert par un couvre-objet à faces parfaitement parallèles.

Par-dessus ce couvre-objet on en met un 2e quadrillé par intervalles de 5 μ.

Il en résulte que chaque carré représente un volume de

$$\frac{25^{mm^3}}{10^7} = 0^{mm^3},0000025.$$

3° On regarde d'un premier coup d'œil s'il y a plus de 5 cellules par carré, dans ce cas on recommence avec une dilution moindre.

4° Si la dilution est convenable, on compte les cellules de 10 carrés d'une ligne, puis d'une 2e, d'une 3e, d'une 4e, d'une 5e.

Pour éviter de faire des doubles emplois avec les cellules posées sur les côtés communs, au lieu de compter les cellules qui sont dans un carré, on compte celles qui sont dans la moitié des carrés comprise entre deux côtés et une diagonale de direction choisie arbitrairement mais toujours la même, en ayant soin d'adopter toujours soit la moitié placée au-dessus de la diagonale, soit l'autre.

On renouvelle cinq fois la préparation, on additionne les 250 nombres lus, on double la somme pour tenir compte des moitiés des carrés négligées et on divise par 250.

Par unité de volume le nombre de cellules doit être environ de 3 lorsque la dilution était au 1/10 ; cela fait pour le levain lui-même 30 cellules dans un volume de $\frac{25^{mm^3}}{10^7}$ ou 12 000 000 par millimètre cube.

En répétant l'opération sur de la levure traitée par le bleu de méthylène ou le bleu d'indigo, on peut se faire une idée du nombre des cellules mortes.

Il ne doit pas y en avoir plus de 3 à 4 pour 100 de la totalité.

Théorie de l'acidification lactique des moûts-levains. — Autrefois on considérait le rôle du ferment lactique comme double.

1° Il était supposé peptoniser les matières albuminoïdes du moût ;

2° Il était considéré comme un antiseptique qui sans trop gêner la levure gênerait les bactéries butyriques, qui agirait pourtant sur la levure à la manière des antiseptiques à faible dose et en surélèverait l'activité.

Cette manière de voir a été combattue. D'une part, Delbruck n'a pas trouvé de peptone ; d'autre part, Effront ne considère pas l'acide lactique comme antiseptique de la levure, mais il fait remarquer que le moût est très concentré, très acide, froid, ce qui pousse à l'activité des levures et cela se comprend si on remarque que beaucoup de matières nutritives disparaissent et qu'il y a une faible multiplication. Il faut donc que les cellules accumulent de l'azote et détruisent beaucoup de sucre par fermentation, c'est-à-dire qu'elles soient très actives.

De plus pour Effront le choix de la température de 50° a correspondu à la sélection d'une espèce donnant peu d'acides volatils qui seraient nuisibles dans les opérations ultérieures.

Peut-être dans la fermentation lactique y a-t-il autre chose que l'acide lactique formé.

A ce point de vue les résultats obtenus en introduisant de l'acide lactique commercial dans le levain seront très intéressants. Actuellement ils sont trop peu nombreux pour être définitifs.

Levains lactiques artificiels. — On a essayé de créer des levains lactiques par introduction directe de l'acide.

Une première difficulté était le prix élevé de ce produit; mais dans ces derniers temps le prix s'est abaissé.

Il vaut encore de 75 à 100 francs les 100 kilogrammes (à 50 pour 100 d'acide).

Mais il y aurait des avantages compensateurs : économie de combustible, de temps, succès certain, etc.

Wehmer a proposé d'ajouter au levain de 1 à 2 pour 100 d'acide lactique et de le laisser longtemps au contact du moût. Il pense que l'on a ainsi un travail normal. Cette opinion a été combattue par Lange.

Moritz a constaté qu'avec 7,5 pour 100 d'acide lactique, il convient de prolonger la fermentation du levain de 24 heures.

Mais à la dose de 3,75 pour 100, en refroidissant pour mettre en fermentation à 16°, on a un travail tout à fait analogue à celui des moûts habituels.

Si cette opinion est justifiée par l'expérience, elle modifiera le travail des levains ; car on gagnera le temps de l'acidification (15 ou 18 heures dans les levains modernes pour une dépense de 75 centimes par hectolitre de levain, c'est-à-dire de 25 centimes pour le levain qui correspond à un mètre cube de moût donnant environ un hectolitre d'alcool absolu.

Emploi d'autres acides. — On a proposé de remplacer l'acidité lactique par une acidité tartrique, mais le prix de l'acide tartrique est trop élevé.

On a aussi pensé aux levains à base d'acide sulfurique ou chlorhydrique, le travail n'y va pas bien, faute sans doute d'acclimatation de la levure.

Cependant on emploie quelquefois un levain à base d'acide sulfurique pour remplacer un levain lactique qui vient à manquer accidentellement.

Levains fluorés. — Effront a eu l'idée de faire des levains acidulés à l'acide fluorhydrique. Ici, il est bien évident que l'acide fluorhydrique agit comme antiseptique, non seulement vis-à-vis des bactéries, mais aussi vis-à-vis des levures.

Le travail est en résumé celui-ci :

30 kilogrammes de malt sec sont brassés de telle manière qu'ils donnent 100 à 125 litres d'un liquide à 20° Balling contenant 10 grammes d'acide fluorhydrique anhydre.

On ramène à 28°, température bien plus élevée que pour les levains ordinaires et on ensemence avec 20 litres de levure mère. Après 18 heures, à la densité de 10° Balling, on prélève la levure mère, on renforce avec 100 litres de moût à 30°.

Ces levains fluorés ne vont pas du tout avec des moûts ordinaires.

Pour obvier à cet inconvénient, Effront n'emploie les levains fluorés que pour des moûts fluorés.

Il part d'une levure acclimatée à une dose double de celle du moût. De sorte que la levure passe d'un milieu plus fluoré à un moins fluoré, ce qui augmente l'accroissement et le pouvoir fermentescible.

On prépare le moût en exagérant le malt, on y ajoute l'acide fluorhydrique, on refroidit à 30° ; on prélève 40 litres de ce moût et on y double la teneur en acide fluorhydrique, on y ensemence avec 10 litres de culture de levure acclimatée ; la température est alors 26°, elle remonte en 25 heures à 31° ; la densité est alors 2°,5 B. On prélève la levure mère et ainsi de suite.

On peut se dispenser d'acheter de la levure acclimatée Dans ce cas on procède ainsi :

Si le moût est concentré,

Dans la 1re opération on met par hectolitre :

7gr,5 d'acide dans le levain;
4 — le moût.

Dans la 2e opération on en met 10 et 5.

Dans la 3e opération on en met 15 et 7,5, etc.

Lorsqu'on constate qu'une augmentation a produit un mauvais effet, on revient en arrière et on s'y tient.

Dans les uns on ne force pas l'aération.

Dans les autres on fait de l'aération artificielle.

Les premiers procédés sont les plus anciens et les meilleurs, ils sont connus sous le nom de procédés de fabrication de levure pressée.

Les autres sont employés pour la fabrication de l'aéro-levure.

Principes de la fabrication de la levure pressée ancienne. — **Généralités.** — La levure pressée est de la levure adulte multipliée dans les meilleures conditions, lavée et pressée pour la conservation.

La production de cette levure exige l'action de l'air.

Cette action est obtenue soit par culture en cuves plates comme dans la méthode hollandaise, et dans ce cas pour que la levure ne soit pas souillée de drèche, on décante le moût au début de la multiplication (1), soit dans des cuves profondes comme dans la méthode viennoise en s'arrangeant pour que la levure vienne surnager.

Moûts de culture. — Dans le cas où la levure doit tomber, le moût ne doit pas être trop concentré car il donnerait trop d'alcool. — Dans le cas où la levure doit surnager, le moût doit être assez dense et plus dense que dans la méthode précédente, et ce moût doit être assez mucilagineux pour que l'acide carbonique devienne adhérent aux cellules et les entraîne dans son mouvement ascensionnel.

Cette viscosité est obtenue grâce à la dextrine due à la saccharification et à l'emploi du seigle qui introduit une gomme dans le moût.

---

(1) Comme on emploie pour amortir de la levure de brasserie on ne décante qu'après 2 heures, de manière à séparer la drèche de la levure en même temps que l'autre.

On compense toujours en partie cet effet de viscosité du seigle par la fluidité de l'huile du maïs que l'on introduit aussi dans le moût.

En d'autres termes par raison d'économie on emploie un excès de seigle que l'on compense par du maïs.

Les moûts doivent avoir une richesse moyenne en azote, trop peu d'azote donne une levure peu active, trop d'azote une levure paresseuse ; en fait, dans la méthode hollandaise on introduit 8 kilogrammes de grains par hectolitre pour la raison indiquée plus haut.

Mais la levure hollandaise sert presque exclusivement en boulangerie.

Dans la levure viennoise on introduit environ 20 kilogrammes de grain par hectolitre de moût.

Il ne faut pas un excès d'acide qui tendrait à solubiliser les albuminoïdes coagulés du levain, et qui jouent un rôle dans l'aération des cellules en formant des bulles servant de supports ; il en faut cependant car il faut pour la nutrition des cellules quelques produits solubles dérivés des albuminoïdes.

Une autre raison qui doit faire rejeter l'excès d'acidité, c'est que cela ralentit le départ des fermentations.

Or, un résultat de ce ralentissement est que dans la levure il y aura des cellules beaucoup plus vieilles que les autres.

Pour la même raison on doit craindre une température trop basse.

Mais d'autre part, une température trop élevée affaiblit la levure.

Les moûts doivent être riches en matière saline, d'où l'addition de vinasse.

Pour obéir à toutes ces conditions :

On saccharifie à 59-60° de manière à ne pas coaguler les matières albuminoïdes.

On dilue le moût produit préalablement refroidi à

32-36° et mêlé au levain, en employant de l'eau froide et de la vinasse à 17°.

Cela a pour effet de ramener la densité à 14° B., l'acidité à la moyenne convenable de 2 à 3 grammes par litre (1), et la température à 22° en été et 26° en hiver.

Il faut remarquer : 1° que la vinasse doit être stérilisée, et 2° qu'on ne doit mettre la vinasse qu'en dernier lieu parce qu'elle est fortement acide et nuirait au levain.

Fermentation. — La cuve est mise en fermentation soit par une addition de levure de brasserie (2^{kgr},25 par 100 kilogrammes de grains) comme dans la méthode hollandaise, soit par un levain amorcé avec de la levure de la fabrique pendant la fabrication courante, ou au début de la fabrication avec une levure quelconque, pure, autant que possible.

La fabrication de ce levain ne diffère pas essentiellement des levains ordinaires pour moût amylacés. Cependant il faut noter les différences suivantes :

1° On les fait plus épais que les levains ordinaires (car on emploie 30-33 kilogrammes de grain par hectolitre de levain au lieu de 20 à 25), ceci est d'autant plus remarquable que les moûts à fermenter sont moins denses que les moûts ordinaires (14° Balling au lieu de 20 à 25°).

Cette manière de faire a pour but de créer un chapeau très épais, très résistant, jouant le rôle de filtre à bactéries au-dessus du moût-levain ;

2° On brasse à 63° de manière à coaguler les albuminoïdes. C'est indispensable pour avoir ensuite dans le moût des bulles abondantes sur lesquelles les cellules sont attachées et s'aèrent (2) ;

3° On prolonge l'acidification au point d'atteindre

(1) Cette acidité dépend des grains employés.

(2) Les matières albuminoïdes du moût proprement dit ne sont pas coagulées.

l'équivalent de 7 à 8 grammes d'acide sulfurique par litre, ce qui est sensiblement le maximum que peuvent supporter les ferments lactiques ;

4° Le levain étant acidulé, on l'étend de son volume d'eau et on le refroidit ;

5° On le met en levure non avec une levure mère, mais avec de la levure de la fabrique (0^{kgr},14 par hectolitre de levain) ; ceci s'explique, avec la levure mère les chances de contamination sont très grandes ; au début de la fabrication on emploie une culture pure quelconque ;

6° Ce levain est mêlé à une partie du moût de manière à faire un pied, ceci n'est pas différent du renforcement des levains ordinaires.

Récolte. — Dans la méthode hollandaise, on attend la fin de la fermentation pour décanter le liquide, récolter la levure, la laver, la presser.

Dans l'autre système, lorsque la fermentation est dans toute son activité (10 heures après le chargement des cuves), la surface est couverte de bulles laiteuses, très grosses, sur lesquelles la levure est étalée.

C'est à ce moment que la récolte doit être faite. C'est l'aspect laiteux qui est le meilleur critérium de la maturité.

La densité est tombée environ du tiers.

La récolte se fait par écumage, on a soin de n'enlever d'une cuve que la moitié de la couche de levure, et on n'en enlève la 2e moitié qu'après avoir écumé toutes les autres cuves.

Cela laisse le temps à la levure de la couche inférieure de s'aérer.

Il faut dans l'écumage éviter de ramasser du moût ; car il contient du sucre qui ne fermentera pas ; de plus, ce moût se mêlera à l'eau de lavage et compromettra la conservation de la levure ; celle-ci est alors tamisée puis mêlée à de l'eau froide où on la laisse se déposer et où l'alcool se dissout.

Cette eau doit être froide pour que les petites cellules surnageant puissent être décantées et pour arrêter la fermentation.

Il ne faut pas que l'eau soit trop froide, toutes les cellules surnageant et rendant la séparation impossible.

Dans certaines usines on lave deux fois, cela a l'inconvénient d'épuiser les levures.

Enfin la levure mère est pressée en deux fois, et empaquetée.

Procédés de l'aéro-levure. — Dans ces procédés on laisse tomber la levure au fond : donc les moûts ne doivent pas être visqueux ; pour cela on élimine les dextrines en faisant ou parachevant la saccharification aux acides ; de plus on coagule les albuminoïdes ; on a même proposé de déféquer à la chaux pour éliminer les gommes.

En tout cas il faut éviter le mélange de la drèche et de la levure, donc il faut filtrer le moût avant de l'ensemencer.

D'autre part, puisque la levure tombe au fond, à moins de décanter le moût, il faut la recueillir à la fin de la fermentation.

Pour qu'il n'y ait pas de cellules trop vieilles et trop étiolées par l'alcool, il faut opérer en moûts dilués (on emploie la moitié des quantités de l'autre procédé ; de sorte que la levure n'a pas, en définitive, à supporter plus d'alcool ; la fermentation dure de 7 à 20 heures).

Mais de plus, la levure vivant en profondeur il faut l'aérer artificiellement pour qu'elle se multiplie ; on agit modérément au début et à la fin de la fermentation, activement pendant la prolifération.

La levure est lavée 2 ou 3 fois.

Cette levure est moins pure que la précédente, elle est plus lente mais passe pour plus durable (si elle est bien exempte de matières albuminoïdes).

On a souvent essayé de réaliser les conditions précé-

dentes avec des moûts de mélasse, mais la difficulté est de décolorer celle-ci pour ne pas avoir de levure brune. Jusqu'à présent on ne paraît pas avoir réussi d'une manière certaine.

Pour terminer ce qui est relatif à la levure pressée et à l'aérolevure nous allons comparer les rendements des trois principales méthodes.

Comparaison des rendements. — Par 100 kilogrammes de grains on a par

La méthode hollandaise ..	$4^{kgr},5$ de levure et	$26^{l},5$ d'alcool
La méthode viennoise.....	11 —	29 —
La méthode de l'aérolevure	25 —	$11^{l},5$ —

Pour établir la comparaison rappelons-nous que 100 kilogrammes de sucre de canne peuvent donner 25 kilogrammes de matières sèches à l'état de levure.

Or, la levure pressée est à 70 pour 100 d'eau, donc 100 kilogrammes de sucre peuvent donner $\frac{25}{30} \times 100$ kilogrammes de levure pressée, soit $\frac{5}{6}$ 100 kilogrammes.

100 kilogrammes de sucre de canne sont équivalents au point de vue de la fermentation à $\frac{162}{171} \times 100$ kilogrammes d'amidon.

Donc 60^{kgr} d'amidon doivent produire $\frac{5}{6} \times \frac{100 \times 60}{\frac{162}{171} \times 100}$

$$= \frac{5 \times 60 \times 19}{6 \times 18} = 52^{kgr},7 \text{ de levure pressée.}$$

D'autre part, dans un travail moyen de distillerie on peut admettre dans les méthodes à l'eau chaude, comme le sont les préparations de levure, que 60 kilogrammes d'amidon fournissent $30^{l},6$ d'alcool.

Donc 1 kilogramme de levure est sensiblement équivalent à $0^{l},6$ d'alcool.

Donc $N = 1 + \frac{40}{24}\frac{J}{V}$.

Si J est très grand,

on prend $\frac{J}{V} = 6$, alors $N = 1 + \frac{5}{3} \times 6 = 11$.

Si J est plus petit ou si l'on ne peut faire 6 levains par jour, on prend par exemple $\frac{J}{V} = 4$.

D'où $N = 1 + \frac{5}{3} \times 4 = 1 + \frac{20}{3} = 7$ ou 8 cuves.

Comme exemple du 2e cas, nous citerons celui des pommes de terre $T = 72$ heures.

Donc $N = 1 + 3\frac{J}{V}$.

Soit $J = KC$, C étant le nombre de macérations par jour $V = \lambda C$,

$$N = 1 + 3\frac{K}{\lambda}.$$

Or, λ est 1/2, 1, 2 ou 3, donc suivant les cas on aura

$$N = 1 + 6K,\quad 1 + 3K,\quad 1 + \frac{3}{2}K,\quad 1 + K.$$

pour $K = 3$. $N = 19$, 10, 6, 4.

Théorie du coupage.

Nous avons vu que, dans un certain nombre de cas dont le plus important est celui de la betterave, on peut se contenter de faire un seul pied pour la première cuve, puis on amorce la suivante avec une fraction de la 1re, et ainsi de suite.

C'est ce que l'on appelle faire un coupage.

Nous allons nous occuper de cette question.

Grandeur du coupage.

On ne fait qu'un seul pied. On coupe la cuve n° 1 dans la cuve n° 2 ; on remplit à la fois 1 et 2, et lorsqu'elles sont pleines, on laisse tomber la cuve n° 1 et on coupe la cuve n° 2 dans le n° 3 et ainsi de suite.

Dans quelle proportion doit-on faire le coupage ? Soient v le volume du pied de cuve contenant n levures actives; V le volume de la cuve que l'on va couper. A ce moment le volume V de moût contiendra un nombre de levures $n \times \alpha$, en désignant par α le coefficient de multiplication des n levures du pied. Pour continuer notre travail dans les mêmes conditions il faudra prélever un volume v contenant n levures.

Puisque dans V on a $n\alpha$ il faudra prendre un volume v tel que

$$\frac{v}{V} = \frac{n}{n\alpha} \quad \text{d'où} \quad v = \frac{V}{\alpha}.$$

Ce nombre α varie de 2 à 13 et v varie de $\frac{V}{2}$ à $\frac{V}{14}$; pour les moûts peu nutritifs, comme ceux de betteraves $v = \frac{V}{2}$.

Moment du coupage. — On ne doit pas faire le coupage à un moment quelconque. Il doit se faire au moment qui correspond pour la levure adoptée et le moût considéré au maximum de α, c'est-à-dire à la fin de la période d'accroissement, c'est ce que nous démontrerons plus loin.

D'ailleurs, il vaut mieux dépasser la fin de l'accroissement que de ne pas l'atteindre parce que dans le 1er cas, les levures sont formées, mais gênées par l'alcool, elles reprennent de l'activité en présence du moût non fer-

menté ; dans le 2[e] cas, toutes les cellules ne sont pas formées.

En fait, si on a affaire à un moût peu riche on adopte, comme moment du coupage, le moment où la densité est de 0,4 — 0,6 supérieure à la densité de chute.

. En général, on a intérêt à prendre le plus de levure possible (n grand) à condition de ne pas exagérer et de ne pas gêner la multiplication. On a aussi intérêt à choisir des levures très prolifiques et à attendre qu'elles soient complètement multipliées (α aussi grand que possible). Nous allons démontrer qu'en opérant ainsi (en prenant α et n grands) on gagne du temps. Pour cela, nous admettrons que lorsqu'une quantité déterminée de sucre doit être détruite par une quantité de levure, le temps employé est proportionnel à la quantité de sucre et inversement proportionnel à la quantité de levure. Prise en elle-même, l'hypothèse est fausse, mais dans nos calculs il s'agira toujours de comparer en milieux identiques des quantités de sucre et de levure très voisines l'une de l'autre, et, dans ces conditions, l'hypothèse peut être considérée comme suffisamment exacte.

Nous admettrons de plus que le taux en sucre est proportionnel à la densité abrégée (1).

Considérons le pied de cuve de densité δ de volume v contenant n cellules. Au pied de cuve on ajoute un volume $(V - v)$ de moût de densité Δ pour compléter le volume V.

On a donc un nombre n de cellules agissant sur une quantité de sucre

$$v\delta + (V - v)\Delta.$$

---

(1) On dit par abréviation qu'un jus de sucre est à la densité δ lorsqu'il a la densité $1 + \frac{\delta}{100}$; nous admettons que ce jus contient une quantité de sucre $K\delta$ (K est voisin de 2).

Au moment d'effectuer le coupage, la densité de la cuve est redevenue δ.

La quantité de sucre qui se trouve alors dans la cuve est $V\delta$. Il a donc disparu une quantité de sucre

$$v\delta + (V - v)\Delta - V\delta = (V - v)(\Delta - \delta).$$

D'après notre hypothèse, le temps nécessaire pour faire disparaître ce sucre est proportionnel à

$$\frac{(V - v)\ (\Delta - \delta)}{n}.$$

Coupons la cuve en lui enlevant un volume v et n cellules. Il lui reste alors le volume $(V - v)$ à la densité δ et $nx - n = (n - 1)x$ cellules. Pour remplir la cuve, on ajoute un volume v de moût à la densité Δ. La cuve contient donc une quantité de sucre $(V - v)\,\delta + v\Delta$, sur laquelle vont agir maintenant $(n - 1)x$ cellules. Le temps que ces cellules mettront à détruire le sucre sera proportionnel à

$$\frac{v\Delta + (V - v)\,\delta}{n(x - 1)}.$$

Telles sont les deux opérations qui se passent dans la cuve ; le temps total pendant lequel la cuve est occupée par les fermentations est donc de

$$\frac{(V - v)(\Delta - \delta)}{n} + \frac{v\Delta + (V - v)\,\delta}{n\,(x - 1)}.$$

Le temps total d'occupation est égal à ce temps plus une constante.

Le temps total est donc d'autant plus petit que n et x sont plus grands. Prendre une levure abondante et prolifique fait gagner du temps.

Du coulage.

Étant donné un levain ou un pied de cuve quelconque, on est amené à y ajouter la masse de moût à fermenter. On peut faire cette addition soit d'un seul bloc, soit par fractions successives. La deuxième méthode est plus avantageuse, car elle fait gagner du temps. Il y a plusieurs raisons de ce fait :

α) La quantité de chaleur dégagée à un moment donné par la fermentation porte sur une quantité plus petite du nouveau moût qui s'échauffe plus que si on l'avait ajouté en grande masse. Or, la chaleur est favorable à la fermentation et celle-ci devient plus rapide. La chaleur dégagée s'accélère puisque la fermentation est plus rapide, donc la vitesse de fermentation s'accélère.

β) En second lieu, l'aération est meilleure, le dégagement de gaz carbonique se fait plus facilement, et la composition du moût ne se modifie que graduellement ; il en résulte que la vie des cellules est plus active et moins troublée.

γ) Enfin, si je prends un pied de cuve de n cellules et si j'ajoute un volume V de moût, j'ai n cellules agissant sur un volume V. Si, au contraire, j'ajoute d'abord un volume v, ces n cellules agissent plus activement sur v que sur V, elles se multiplient et un instant après j'ai n' cellules ($n' > n$) agissant sur un nouveau volume v.

Le mouvement s'accélère donc et chaque fraction v va disparaître de plus en plus vite. Donc la vitesse moyenne sera supérieure à la vitesse d'action de n cellules sur v et *a fortiori* à la vitesse d'action de n sur V.

Le plus ordinairement on ajoute le moût par fractions infiniment petites : c'est le *coulage* (1).

(1) Même lorsqu'on effectue le coupage de moûts épais, on ne peut

On doit conduire le coulage assez lentement pour que la densité δ du pied ne se relève pas. En réalité, dans ces conditions, il faut plus de temps pour remplir la cuve, mais comme dès qu'elle est remplie on peut la couper, on gagne du temps. Cela est facile à comprendre. Un calcul permet de le démontrer.

Soit n le nombre de cellules au début. Faisons couler lentement de façon à maintenir la densité δ. Soit t le temps du remplissage. Soit μ la multiplication d'une cellule dans le temps 1. Chaque cellule a donc fourni au bout du temps t

$$(1 + \mu)^t \text{ cellules}$$

et comme nous avons n cellules, on a

$$n\,(1 + \mu)^t = n\alpha$$

cellules au bout du temps t.

Coulons plus rapidement. Nous remplissons en un temps $t' < t$. Nos n cellules sont devenues $n\,(1 + \mu')^{t'}$ où μ' est inférieur à μ, car μ' est la multiplication pendant le remplissage rapide où l'aération est moindre.

Soit t'' le temps qu'il faut attendre après le remplissage de la cuve pour que la densité devienne δ. Soit μ'' le taux de la multiplication pendant l'unité de temps : cette quantité est inférieure à μ', car le moût est fortement alcoolique.

Les $n\,(1 + \mu')^{t'}$ cellules deviendront, si la cuve arrive à être dans le même état que par le coulage lent,

$$n\,(1 + \mu')^{t'}(1 + \mu'')^{t''} = n\alpha.$$

effectuer le coulage, car il y a difficulté d'écoulement et de plus on bouleverse le chapeau protecteur des moûts amylacés peu concentrés sur lesquels on peut pratiquer le coupage. En outre la préparation des moûts amylacés en général étant discontinue, cela n'est pas favorable au coulage.

On peut donc écrire

$$(1+\mu)^t=(1+\mu')^{t'}(1+\mu'')^{t''}$$

et comme $\mu' > \mu''$

$$(1+\mu)^t < (1+\mu')^{t'+t''}$$

et comme $\mu < \mu'$ il faut que l'on ait

$$t'+t'' > t.$$

On gagne donc du temps en coulant lentement.

Nombre de cuves.

Soit T la durée d'occupation d'une cuve. Ce temps comprend la durée du premier remplissage, la durée du second remplissage après le coupage, le temps de la distillation et du nettoyage. Si pendant ce temps T l'usine fabrique de quoi remplir n cuves, l'usine devra posséder $n+1$ cuves. On ne peut avoir des cuves trop grandes parce que : 1° la construction est plus coûteuse que pour les cuves moyennes (épaisseurs plus grandes, pièces de bois plus cher) et 2° lorsqu'une cuve est ratée les pertes sont plus grandes.

On ne peut pas avoir non plus de cuves trop petites : 1° la constrution en est en effet plus coûteuse que pour les cuves moyennes (surface latérale plus grande) ; 2° à cause de cette surface latérale plus grande le refroidissement y est plus fort, et 3° la surface occupée sur le sol est plus grande, et en même temps la surface libre étant également plus grande on a plus de chances de contamination.

Dans les conditions où nous nous sommes placés, il faut pouvoir couper à des intervalles de temps de $\frac{T}{n}$. Voyons de quoi dépend $\frac{T}{n}$.

T est la somme des temps nécessaires

Pour le 1er remplissage Pour le 2e — Pour la distillation.	temps indépendants de la grandeur des cuves si les appareils de l'usine sont bien proportionnés.

et enfin du temps de nettoyage qui est proportionnel à la surface des cuves.

Si on admet que les cuves ont toujours le même rapport dans leurs dimensions, la surface et par suite le temps du nettoyage seront proportionnels à $V^{\frac{2}{3}}$.

Il en résulte que T est de la forme $K + \lambda V^{\frac{2}{3}}$ où K est une constante.

$$\frac{T}{n} \text{ est donc de la forme } \frac{K}{n} + \lambda \frac{V^{\frac{2}{3}}}{n}.$$

c'est-à-dire que $\frac{T}{n}$ dépend :

1° D'une constante K qui elle-même dépend de la nature du moût, du mode de travail et de la nature des appareils à distiller ;

2° Du volume et du nombre des cuves ; il est inversement proportionnel au nombre des cuves.

Avec les betteraves on peut avoir $\frac{T}{n} = 4$; $T = 16\text{-}20$ d'où $4 = \frac{16 \text{ ou } 20}{n} = 4$ ou 5, et N, nombre total des cuves, 5 ou 6.

Coulage sur trois cuves.

Le coulage sur trois cuves consiste en ceci : On coupe 1 sur 2. Quand 1 et 2 sont pleines, on prélève 1/3 de 1 et 1/3 de 2 qu'on envoie dans 3 et on coule le moût à la fois sur 1, 2, 3. Quand elles sont pleines, on abandonne 1 et on recommence avec 2, 3 et 4. Il est facile par un calcul analogue à celui de tout à l'heure de voir qu'en opérant ainsi on gagne du temps.

En effet dans le coupage à 2 nous avons vu que le temps était proportionnel à

$$\frac{(V-v)(\Delta-\delta)}{n}+\frac{(V-v)\,\delta+v\Delta}{n(\alpha-1)}$$

avec la condition $\alpha=2$,

$$\frac{(V-v)\,\Delta+v\Delta}{n} \text{ ou } \frac{V\Delta}{n}.$$

Dans le coupage à 3 on a un pied contenant $\frac{2}{3}V$ et contenant $\frac{2}{3}n\alpha$ cellules, avec la condition $\alpha=2$; on le complète avec $\frac{V}{3}$ de densité Δ, on attend que la densité soit δ, on a donc détruit $\frac{V}{3}(\Delta-\delta)$, à l'aide de $\frac{2}{3}n\alpha$ cellules.

Le temps nécessaire est donc

$$\frac{\frac{V}{3}(\Delta-\delta)}{2/3\,n\alpha} \text{ et pour } \alpha=2\,; \frac{\frac{V}{3}(\Delta-\delta)}{2/3\,2n}=\frac{V(\Delta-\delta)}{4n}.$$

Pendant cette première partie de l'opération quelle a été la multiplication ? Soit β ce qu'est devenue une cellule. Or, nous avons admis dans le coupage sur deux cuves que la multiplication était $\alpha=2$ quand on double le volume du pied. Ici on ajoute à un pied $\frac{2}{3}V$ un volume $\frac{V}{3}$ et une cellule devient β. Si on pouvait ajouter un nouveau volume $\frac{V}{3}$ on aurait pendant cette addition une multiplication nouvelle β' un peu moindre que β car alors on a au début plus de cellules que la première fois. La multiplication résultante de ces deux additions serait telle qu'une cellule serait devenue $\beta\beta'$.

Or, à ce moment elle serait devenue 2 puisque l'addition successive à

$$\frac{2}{3}V \text{ de } 2 \text{ fois } \frac{V}{3} \text{ en doublerait le volume.}$$

Donc $\beta\beta' = 2$
et comme $\beta > \beta'$, $\beta > \sqrt{2}$.

Prenons $\beta = \frac{3}{2}$.

Par conséquent les $\frac{2}{3}n\alpha$ cellules du pied sont devenues

$$\frac{2}{3}n\alpha \times \frac{3}{2} = n\alpha.$$

On prend les 2 tiers de la cuve, c'est-à-dire $\frac{2}{3}n\alpha$ cellules sur lesquelles on fait couler $\frac{V}{3}$ à Δ, de sorte qu'il disparaît encore $\frac{V}{3}(\Delta - \delta)$ de sucre exigeant un temps proportionnel

$$\frac{\frac{V}{3}(\Delta - \delta)}{\frac{2}{3}n\alpha} \text{ et pour } \alpha = 2; \frac{V(\Delta - \delta)}{4n}.$$

Ces cellules vont encore redevenir $n\alpha$. En laissant deux tiers de la cuve, on laisse encore $\frac{2}{3}n\alpha$ cellules qui vont faire tomber la cuve complètement, c'est-à-dire s'attaquer à $\frac{2V}{3}\delta$ de sucre restant $+\frac{V}{3}\Delta$ de sucre de remplissage.

Il faudra donc un temps proportionnel à

$$\frac{2\frac{V\delta}{3} + \frac{V}{3}\Delta}{\frac{2}{3}n\alpha} \text{ et pour } \alpha = 2; \frac{V(\Delta + 2\delta)}{4n}$$

Donc, le temps total est proportionnel à

$$\frac{V(\Delta-\delta)}{4n}+\frac{V(\Delta-\delta)}{4n}+\frac{V(\Delta+2\delta)}{4n}=\frac{V.3\Delta}{4n}.$$

Le temps est donc $\frac{3}{4}\frac{V\Delta}{n}$ au lieu de $\frac{V\Delta}{n}$. On a donc gagné du temps.

La réalisation de ce système exige plus de surveillance que le système habituel, on ne l'emploie que lorsqu'on veut forcer un peu la production de l'usine avec un matériel donné ou lorsque, au lieu de 5 à 6 cuves, on n'en a par exemple que 4 ou 5.

Méthode de la cuve mère.

Il y a des cas au contraire où le nombre de cuves est plus grand que celui prévu par les considérations précédentes.

Il faut alors dans ce cas couper plus souvent, mais comme $\frac{T}{n}$ est à peu près constant, on serait amené à couper avant le moment favorable. Comment éviter cela. On emploie la méthode de la cuve mère. Dans cette méthode la cuve 1 est remplie par un moût beaucoup plus riche que le moût normal. On coupe 1 sur 2, on remplit 1 et 2 et on laisse alors tomber 2, puis on coupe de nouveau 1 sur 3 et ainsi de suite. Comme la cuve 1 était très riche au début, pendant un certain temps elle restera plus riche malgré les coupages et les additions de moût. La fermentation y sera plus active que dans les cuves à couper d'après la méthode générale et on pourra faire des coupages plus rapides.

Cette méthode marche avec 6 ou 8 cuves. Si l'on a

plus de 8 cuves, on fait deux séries (1), mais il est inutile de faire deux pieds de cuve.

Méthode des deux séries.

Appelons les cuves des deux séries 1, 2, 3, etc., et 1bis, 2bis, etc.

Au début, on fait un pied de cuve dans 1, puis on coupe 1 sur 1bis ; mais on ne coupe pas de moitié ; on n'envoie dans 1bis que le tiers de 1. Cela fait, on coule lentement sur 1 et rapidement sur 1bis.

Il résulte de là que 1 va prendre une certaine avance sur 1bis puisqu'elle a un pied plus grand et qu'on coule plus lentement.

En travaillant dans les 2 séries à partir de 1 et de 1bis, il est évident que les cuves terminées de la série bis vont s'intercaler entre celles de l'autre série, ce qui régularise le travail de distillation.

Grandeur des cuves de fermentation.

Si on procède par coupage, la grandeur des cuves est un peu arbitraire, comme on vient de le voir puisqu'on peut travailler avec un nombre de cuves variant de 5 à 12.

Soit J la production journalière d'une usine travaillant par coupage, T la durée d'occupation d'une cuve, V son volume, N le nombre total de cuves.

Par jour on fait $\frac{J}{V}$ cuves. Dans le temps T on en fait $\frac{T}{24}\frac{J}{V}$.

(1) Même si on faisait deux pieds, il faudrait faire le deuxième avec un retard relativement au premier, de manière que deux cuves ne tombent pas en même temps puisqu'il y en aurait une qui attendrait pour être distillée que l'autre soit vide.

Pour avoir le nombre total de cuves, il faut ajouter à celles qu'on peut remplir dans le temps T celle qui est occupée.

Donc $$N = 1 + \frac{T}{24}\frac{J}{V},$$

$$NV \text{ capacité totale de la cuverie} = V + \frac{T}{24}J.$$

Par exemple pour les betteraves

si $T = 16$ heures, $N = 5$ c'est-à-dire $1 + \frac{16}{24}\frac{J}{V} = 5$,

$$V = \frac{J}{6},$$

$$NV = \frac{5}{6}J,$$

$T = 20$ heures, $N = 6$ — $1 + \frac{20}{24}\frac{J}{V} = 6$,

$$V = \frac{J}{6},$$

$$NV = J.$$

C'est la capacité habituelle d'une cuverie de moût de betteraves. Une cuverie de moût de betteraves a le volume de la production journalière.

Fermentation des moûts.

Nous avons mis en contact la levure avec le moût, il nous reste à dire comment se passe la fermentation de ce moût.

La marche de la fermentation dépend de quatre facteurs : de la température initiale, de la quantité et de la qualité de la levure, de la concentration du moût, de la présence des antiseptiques.

Température initiale.

La température de 26 à 28° est la plus favorable à la multiplication des cellules.

La température initiale dépend de plusieurs facteurs.

Concentration. — La fermentation qui dégage une quantité de chaleur assez considérable (1° par 0,8 Balling), amène ainsi une élévation de la température du moût ; l'on risque donc, si l'on commence la fermentation trop haut, de dépasser la température de 32-33° à laquelle se produit l'involution des levures. C'est pourquoi plus un moût d'une espèce déterminée est concentré plus on le prépare froid.

Nature du moût. — La température initiale dépend de la nature du moût. Si les moûts ont une tendance à donner une fermentation tumultueuse, c'est-à-dire s'ils sont relativement visqueux et épais, il faudra prendre pour température initiale une température relativement basse afin que la fermentation soit moins active. Toutes choses égales d'ailleurs, on commencerait avec

les pommes de terre.	à 18°
les grains.............	à 19°
les betteraves.........	à 20°
le maïs................	à 22°
les mélasses..........	à 24-25°

Les moûts amylacés ont une tendance à s'acidifier aux températures élevées plus que les moûts sucrés ; nouvelle raison pour commencer le travail d'un pareil moût plus bas que celui des moûts sucrés.

Acidité initiale. — La température initiale dépend également de l'acidité primordiale existant dans le moût. Cette acidité est d'environ 2gr,5 pour les betteraves.

Dans les environs de ce titre, plus il y a d'acidité, plus la fermentation est lente au début et plus il faut commencer haut.

On a adopté ce chiffre 2gr,5 un peu empiriquement, parce qu'avec lui les fermentations tournent ordinairement bien. Il n'en est pas moins vrai que l'on peut réussir une

fermentation avec une acidité beaucoup moindre, $1^{gr},5$-2 grammes. Cela dépend de la levure.

Le mieux est de procéder par tâtonnement.

Pour les mélasses on adopte souvent la même acidité.

Effront pense qu'en prenant la précaution d'éliminer certaines bactéries, soit par filtration au filtre-presse, soit par précipitation à l'aide de tanin, d'alumine ou de blancs d'œufs, on peut opérer avec une acidité de 1 gramme.

Pour les moûts amylacés, l'acidité est voisine de 1 gramme.

Nature des cuves. — La température initiale dépend encore de la nature des cuves. La perte de chaleur due au rayonnement est plus grande avec les cuves en fer qu'avec les cuves en bois.

Les cuves hautes tendent à donner une fermentation plus tumultueuse que les basses cuves. Les grandes cuves offrent une plus petite surface latérale relative. Elles ont donc une tendance à se refroidir moins vite que les petites et la fermentation doit être commencée à une température un peu plus basse. On commence généralement pour de pareilles cuves, avec un moût épais, à la température de 16°.

Moyens de réfrigération. — Si l'on parvient à refroidir un moût, le danger de dépasser 32-33° n'existe plus et l'on est maître de la température initiale. Donc les cuves disposées pour le refroidissement permettent de débuter à une température plus élevée.

Moyens d'agitation. — L'agitation (1) produit deux effets contraires. Elle refroidit et en même temps permet le dégagement de gaz carbonique, or ce dégagement est

---

(1) Un autre effet de l'agitation est d'éviter les mousses, ce qui permet de remplir plus les cuves, chose très importante dans les pays où l'impôt est à la capacité des cuves.

favorable à l'activité de la fermentation, ce qui tend à relever la température. Il y a par conséquent une action résultante assez incertaine sur la température. Il n'en est pas moins vrai que la température initiale dépend de la possibilité d'agiter le moût dans les cuves. L'agitation au mouvron cause une évaporation spéciale d'alcool, mais cette évaporation est bien moindre que celle résultant de la formation des grosses bulles d'acide carbonique.

Local. — La température initiale dépend aussi de la température du local où sont les cuves. Le refroidissement est en effet proportionnel à la différence des températures intérieure et extérieure.

Levures. — Enfin cette température initiale dépend des levures. Il est évident que si on prend des levures riches en cellules jeunes la fermentation sera active et on devra commencer à une température plus basse.

Enfin si la levure est infectée de bactéries on a intérêt à baisser la température du moût le plus possible pour éviter le développement des infections.

Nature et quantité de la levure.

En second lieu, la marche de la fermentation dépend de la nature et de la quantité de la levure. Plus il y a de levure active, plus la fermentation est rapide.

En France, on met un poids de 3 pour 100 du poids du sucre en levure de bière ou $1^{kgr},5$ en levure pressée. Cela fait par mètre cube de moût à 10 pour 100 de sucre 3 kilogrammes de levure. Dans un levain pour moût à 20 pour 100 on met également 3 litres de levure pour 1 mètre cube de moût (200 kilogrammes de sucre). Cela suppose une multiplication de 2, elle est d'au moins 4.

Remarquons qu'une même quantité de levure employée dans un pied produit une fermentation plus active dans

de grandes cuves que dans une série de petites cuves de même volume total. Cela tient à ce que les pieds de cuve sont toujours de même hauteur quelque soit le volume des cuves et que par conséquent la surface de refroidissement est plus grande pour les petites cuves que pour une grande cuve de volume équivalent. Il faudra donc dans le cas des petites cuves commencer à une température plus élevée, ce qui n'est guère possible, ou mettre une quantité plus grande de levure.

Exemple : Dans les cuves de 200 hectolitres de moût à 10 pour 100 on mettrait 60 kilogrammes de levure. Dans 4 cuves de 50 hectolitres on en mettrait $20 \times 4 = 80$ kilogrammes.

Lorsqu'une levure n'est pas pure, les impuretés jouent un rôle dans la marche de la fermentation.

Les bactéries tendent à se développer et il peut arriver qu'une fermentation soit moins active en été qu'en hiver, car les bactéries peuvent, grâce à une température élevée, prendre le pas sur la levure.

Concentration des moûts.

La marche de la fermentation dépend de la concentration du moût. D'une manière générale on peut dire que les moûts concentrés donnent relativement plus de levure que les moûts dilués tandis que les moûts dilués donnent plus d'alcool que les premiers.

Soit D la densité d'un moût.

Si $D > 1{,}105$ la fermentation ne marche pas, car l'eau est en quantité insuffisante pour que les échanges entre le milieu et la levure se fassent convenablement.

Si $D = 1{,}09$ ou $1{,}10$ (moût épais) (1) la fermentation

(1) Ces moûts très épais ne sont employés que pour des raisons fis-

s'effectue encore mal et il faut agiter pour faciliter le dégagement de gaz en même temps que refroidir.

Si D = 1,06 ou 1,08 (moût concentré), la fermentation donne moins d'alcool que les moûts dilués et plus de levure ; mais la perte en alcool est souvent plus petite et l'alcool obtenu plus pur. Ceci est dû à la protection du chapeau contre l'évaporation et les bactéries pouvant venir de l'extérieur.

Si D = 1,06-1,04 (moût ordinaire), le rendement en alcool est plus grand que dans le cas précédent, mais l'évaporation est également plus grande (car en général le chapeau n'existe pas), de sorte qu'il y a plus ou moins compensation : la quantité de levure produite dans cette sorte de moût est moins grande que dans les précédentes.

On va cependant plus vite que dans le cas précédent et le rendement par rapport au temps est meilleur.

Si D < 1,04 les fermentations sont rapides mais exigent beaucoup de levure, le moût est en effet pauvre en matières alimentaires. Il faut le travailler à température élevée, ce qui est favorable à l'évaporation ; de plus la distillation est plus coûteuse puisque le moût est plus dilué.

Donc, si l'on veut faire beaucoup d'alcool et rapidement, il faut prendre autant que possible un moût moyen. Les moûts épais sont réservés au travail imposé par certaines raisons fiscales.

En fait, les dilutions sont très variables.

Influence des antiseptiques.

En général, ils tendent à ralentir le départ des fer-

---

cales; ils exigent du malt très sain, et des levures énergiques. Ils ont l'avantage de donner un alcool plus pur, d'exiger des colonnes à distiller plus petites, et de laisser des vinasses plus concentrées et plus recherchées.

mentations sans pour cela que l'opération totale soit plus longue.

C'est pourquoi, en présence d'antiseptiques, on part d'une température plus élevée.

Il faut remarquer qu'on ne craint pas alors les mauvaises fermentations.

Classification des fermentations.

D'une manière un peu artificielle on peut classer les fermentations ainsi :

Fermentation à chapeau.

La fermentation à chapeau est celle pour laquelle le chapeau se maintient toujours à la surface du liquide. Elle ne peut avoir lieu qu'avec un moût contenant d'abord des drèches et ensuite relativement peu riche en sucre ; si celui-ci est un peu abondant, la quantité de gaz fourni est considérable et disloque le chapeau. La fermentation à chapeau est le cas normal des moûts de mélasses mélangés de grains ; c'est une preuve de langueur pour un moût de grains ou de pommes de terre.

Fermentation ascendante et descendante.

Dans la fermentation ascendante et descendante le chapeau très épais monte et descend sans se disloquer sous l'influence d'un fort dégagement de gaz. C'est le cas normal des moûts épais de grains ou de pommes de terre où il se forme un chapeau solide et d'où il se dégage beaucoup de gaz carbonique.

Fermentation circulaire.

Dans la fermentation circulaire la masse se soulève plus ou moins au centre et forme des bulles qui vont ricocher sur la paroi de la cuve, s'y divisent en plus petites bulles rejetées vers le centre. C'est le cas de la fermentation du moût de betteraves.

Fermentation mousseuse.

Souvent dans les fermentations il se forme des mousses abondantes qui peuvent amener des débordements.

Cela arrive par exemple pour un moût de mélasses trop chaud et trop concentré mis sur un pied de cuve. Celui-ci est d'abord gêné mais la fermentation reprend le dessus d'une manière presque explosible.

C'est surtout dans le cas des pommes de terre que les mousses peuvent se produire.

Ce sont les pommes de terre riches en matières albuminoïdes, c'est-à-dire les pommes de terre non mûres ou très riches en azote total qui présentent cet inconvénient ; en particulier les pommes de terre cultivées sur engrais azotés sont très dangereuses.

On a proposé pour éviter cet inconvénient de chercher à se débarrasser des matières albuminoïdes, soit par une saccharification à température élevée (coagulation), soit par une peptonisation à l'aide de 1 gramme d'acide sulfurique ou de pepsine.

Une autre cause des mousses est l'état d'émulsion que produisent certains systèmes d'agitateurs. L'air ainsi emprisonné pousse à la multiplication des cellules et plus tard à une fermentation trop active.

La principale cause des mousses est justement l'acti-

vité de la levure. Avec des matières premières ayant une tendance à mousser, on doit employer une levure moins active. Pour cela on cultive le levain à partir d'une température un peu élevée et on supprime le renforcement.

Lorsque la mousse se produit on ajoute du suif, du vieux beurre, du dégras, du savon, de l'huile.

Le pétrole est mauvais car il passe avec l'alcool à la distillation.

Avec les moûts pas trop épais une injection d'air comprimé est un excellent remède, mais cela cause une perte de 2 pour 100 d'alcool.

Aération.

Cela m'amène à parler de l'effet de l'aération sur les moûts.

Faut-il aérer les moûts? Il y a des avantageset des inconvénients. L'aération chasse le gaz retenu par la viscosité, tue les bactéries anaérobies, rend le milieu moins réducteur, renouvelle la surface de contact de la levure et du moût; mais elle provoque une perte d'alcool, pousse à la multiplication des cellules plutôt qu'à la fermentation et donne par oxydation de l'acide acétique.

Il en résulte qu'une aération ne doit être faite que dans des cas spéciaux et à des moments donnés.

On doit aérer les cuves profondes et seulement à la fin de l'opération pour chasser le gaz. Les pieds de cuve peuvent être également aérés mais au début.

Il faut de même aérer dans certains cas pathologiques : lorsque par exemple la fermentation secondaire des moûts amylacés devient paresseuse, dans le cas d'une infection de bactéries anaérobies et enfin dans le cas de mousse persistante.

Marche des opérations.

Pour terminer ce qui est relatif à la fermentation des moûts, nous donnerons le principe de la marche des opérations.

Betteraves et mélasses.

Dans le cas de la betterave, on procède toujours de la manière suivante : Ayant préparé le pied, lorsque la densité est tombée à 0,3 ou 0,4 au-dessus de la densité de chute on fait couler du moût (préparé à environ 22-24°) de telle manière que la densité de la cuve ne remonte pas et que sa température se maintienne à 28°.

Nous avons démontré qu'on gagne ainsi du temps.

On peut conduire la fermentation des mélasses de la même manière. Mais il est encore d'usage dans certaines fabriques d'envoyer la *mélasse* par couches successives, dont on remonte d'ailleurs la densité. Cette manière est vicieuse, elle n'a de raison d'être que l'état du matériel qui ne permet pas de conserver une provision du moût pour faire le coulage.

Pendant le temps du remplissage des cuves on voit pour ainsi dire deux sortes de bulles : les petites bulles proprement dites d'une fermentation circulaire et les bulles d'air dues à la chute du liquide.

Lorsque celles-ci prédominent et masquent les autres, c'est une preuve du manque d'activité des fermentations.

Lorsque l'on ne coule plus sur une cuve, on ne voit plus alors que les bulles de la fermentation circulaire, la température s'élève au-dessus du chiffre adopté ; puis les bulles cessent tout à coup lorsqu'il n'y a plus de sucre fermentescible, et la surface devient tranquille.

La chute pour les betteraves se fait à 0 ou 0,4 suivant qu'on travaille à l'eau ou à la vinasse. La chute pour les mélasses est environ au tiers de la densité du moût.

Dans le cas des mélasses il arrive souvent que la fermentation s'arrête alors qu'il y a encore du sucre. Cela tient au manque de sucrase des levures.

Pendant la fermentation normale des betteraves ou des mélasses, l'acidité s'élève de $0^{gr},2$-$0^{gr},3$ par litre.

Matières amylacées.

La fermentation des matières amylacées travaillées aux acides ressemble beaucoup à celle des mélasses.

Il n'en est pas de même de la fermentation des moûts amylacés travaillés au malt. En effet, ceux-ci contiennent encore de la dextrine qui sous l'influence persévérante de la diastase se saccharifie lorsque la maltose a disparu.

De sorte qu'il y a une phase complémentaire de fermentation succédant à la fermentation de la maltose préexistant dans le moût.

On distingue dans ces fermentations :

La période de départ ;

La fermentation principale ;

La fermentation complémentaire.

La 1re période correspond à la multiplication de la levure, il y a un faible dégagement d'acide carbonique laissant la masse inerte, on voit sur les bords des places blanches couvertes de bulles légères. Après 2 heures, toute la surface est couverte de ces bulles. Après 5 ou 6 heures, un chapeau bombé au milieu s'est formé.

Cette période de départ dure de 20 à 30 heures, il ne faut pas la prolonger d'une manière excessive par crainte des infections. Pendant cette période la température monte de 4° à 5°.

La fermentation principale est caractérisée par l'in-

version et la fermentation de la maltose; le dégagement du gaz carbonique devient violent; le chapeau se fendille et disparaît si le moût est suffisamment épais; un remous part des parois et va au centre.

La température s'élève pendant cette période de 13° si le moût était à 20° Balling et de 15° s'il était à 25.

Il faut avoir soin de ne pas dépasser 28-30° (1), pour cela on emploie les réfrigérants. Autrefois on allait jusqu'á 32-33° et pour ne pas dépasser cette température on commençait la fermentation très bas. Mais avec des moûts très épais il faudrait commencer à 12° (2), ce qui donnerait une fermentation lente et peu de multiplication.

La fermentation principale dure de 16 à 24 heures.

La fermentation complémentaire commence lorsqu'il n'y a plus de maltose; le dégagement diminue, le chapeau se reforme, puis le gaz diminuant encore le chapeau non soutenu s'enfonce.

Le liquide apparaît alors jaune, il marque encore 1° Balling.

Autrefois, pendant cette période complémentaire, on laissait monter le moût à 33°. Aujourd'hui on le redescend de 28° à 25°. On ne remonte à 30° que tout à fait à la fin pour produire l'involution.

Cette manière de faire est un peu paradoxale car : 1° l'inversion de la dextrine est plus facile à 28° qu'à 25° et 2° la fermentation est plus active.

---

(1) Si on commence à fermenter à 20° on refroidit vers la 15e heure, on a proposé de commencer à 23° et de refroidir plus tôt. La levure se multiplie trop au début et est peu active.

C'est une faute d'attendre que la température soit à 26-28° pour refroidir brusquement.

(2) Il y a d'ailleurs impossibilité matérielle de refroidir à 12°, l'eau ayant ordinairement presque cette température.

La raison que l'on donne de cette manière de faire est qu'on a intérêt à procéder ainsi parce que cela gêne les fermentations bactériennes.

Quelquefois, au moment de finir la fermentation principale, on dilue par de petites additions successives d'eau. Cela modère la température et diminue le titre en alcool, chose favorable à la suite de la fermentation.

INTERVENTION DES ALGUES EN DISTILLERIE

EFFETS UTILES

Au point de vue utile, le ferment lactique joue un rôle important que nous avons indiqué.

EFFETS NUISIBLES

Matières premières.

Quant aux effets nuisibles, ils sont nombreux. Rappelons d'abord qu'une algue voisine des bactériacées, le leuconostoc mésenteroïdes, et que le ferment glucosique attaquent les mélasses. Il en est de même du ferment acétique surtout dans les pays chauds.

Mais le rôle des bactéries se fait surtout sentir pendant les fermentations où, sous de mauvaises influences, elles arrivent à se développer et à prendre le pas sur les levures, diminuant le rendement dans des proportions considérables.

Moûts de Betteraves.

Dans le cas du travail des betteraves, il peut se développer trois sortes de fermentations vicieuses : la fer-

mentation lactique, la fermentation butyrique, la fermentation nitreuse.

Fermentation lactique.

Le gaz se ralentit, l'acidité croît, le moût contient des bactéries lactiques visibles au microscope.

C'est une infection qui peut provenir soit de l'extraction du jus, soit du pied de cuve fait dans des appareils mal nettoyés et à une température trop basse qui a gêné le départ de la levure.

Cette infection s'évite facilement par la propreté du matériel et la bonne température du pied de cuve.

Quand elle s'est déclarée sur le pied, on doit en relever la température et en monter l'acidité ; si elle se déclare sur le moût, on doit ajouter de l'acide.

Fermentation butyrique.

Le gaz se ralentit, l'acidité croît, le moût devient noirâtre, a une odeur butyreuse ; le microscope montre des ferments butyriques.

L'infection peut provenir de l'extraction du jus, ou porter sur le pied qui après avoir eu une température trop basse ayant arrêté la levure, est rechauffé trop fort.

Une autre cause de cette infection est une grande acidité organique.

On évite cet accident par la propreté, la bonne température du pied, la bonne maturité des betteraves.

Lorsque l'infection est déclarée, pour l'arrêter il convient de considérer deux cas.

Si elle est due à une trop forte acidité organique, on doit abaisser celle-ci avec de l'eau ou de la craie.

Si elle est due à une autre cause, on relève l'acidité sulfurique.

Il faut bien remarquer que si dans le premier cas on mettait de l'acide sulfurique, on exagérerait encore l'acidité organique par suite de la décomposition des sels organiques de la betterave.

Fermentation nitreuse.

Enfin, il existe dans les moûts de betteraves une autre sorte d'infection.

La fermentation nitreuse caractérisée par un dégagement de vapeurs nitreuses, dues sans doute à la réduction des nitrates.

La cause est microbienne car elle cède aux antiseptiques, mais on ne sait encore si c'est l'effet de l'hydrogène dégagé par un ferment butyrique ou si c'est l'effet d'un microbe spécifique.

Une des causes de cet accident est la présence des nitrates dans le moût, présence que l'on évite autant que possible en ne travaillant pas des betteraves de terrains irrigués par des eaux vannes ou des vinasses.

Le remède est d'abord d'aérer et d'augmenter l'acidité. Une addition de $8^{gr},5$ d'acide fluorhydrique anhydre (1) par hectolitre, en plusieurs fois, coupe court aux fermentations nitreuses.

Dans tous ces accidents, on doit arrêter le coupage, nettoyer le matériel et refaire un pied.

Moûts de Mélasses.

Accidents analogues.

Dans le cas des mélasses, les mêmes accidents peuvent se produire, mais il en est de spéciaux.

---

(1) 10 centimètres cubes d'acide commercial ramenés à 1 litre.

Fermentation visqueuse.

Une fermentation visqueuse due au leuconostoc introduit par les mélasses elles-mêmes peut se déclarer. On évite cet accident en soignant le dénitrage (1) ; l'accident n'est pas trop grave car la plupart des produits du leuconostoc fermentent tout de même ; le mieux est d'évacuer la cuve le plus vite possible, de nettoyer et de refaire un nouveau pied.

Fermentation boueuse.

Un accident particulier aux mélasses est la fermentation boueuse.

La fermentation se ralentit, le moût se couvre d'une boue noirâtre formée de levures mortes, de bactéries en chaîne et d'un diplocoque visible par coloration en violet.

On évite cet accident en soignant le dénitrage ; on l'arrête en augmentant l'acidité, en insufflant de l'air ; l'acide fluorhydrique n'agit pas.

Fermentation languissante.

Les mélasses fermentant subissent souvent un arrêt de fermentation. Dans certains cas cet arrêt est dû à la présence d'acides gras venus des tonneaux à huile qui servent parfois au transport des mélasses ou à celle d'antiseptiques provenant de la caramélisation des mélasses. Ces accidents ne sont pas du cadre de cette étude.

Mais Effront a montré des accidents de langueur dus

---

(1) Ebullition de la mélasse avec de l'acide sulfurique.

à une bactérie qui résiste au dénitrage et dont il propose de se débarrasser par précipitation au tanin ou au blanc d'œuf, ou par simple filtration.

Moûts amylacés.

Les moûts amylacés n'ont guère d'accidents à craindre si les levains préparés sont actifs. D'ailleurs, la basse température du début ne permet guère le développement des bactéries. En tout cas c'est le ferment acétique qui prend surtout le pas.

Dans la préparation des levains, pendant le refroidissement qui suit la fermentation lactique, lorsque celle-ci n'a pas été bonne, on peut craindre les infections butyriques. Enfin lorsque les levains attendent trop longtemps leur emploi, ils laissent développer des ferments acétiques.

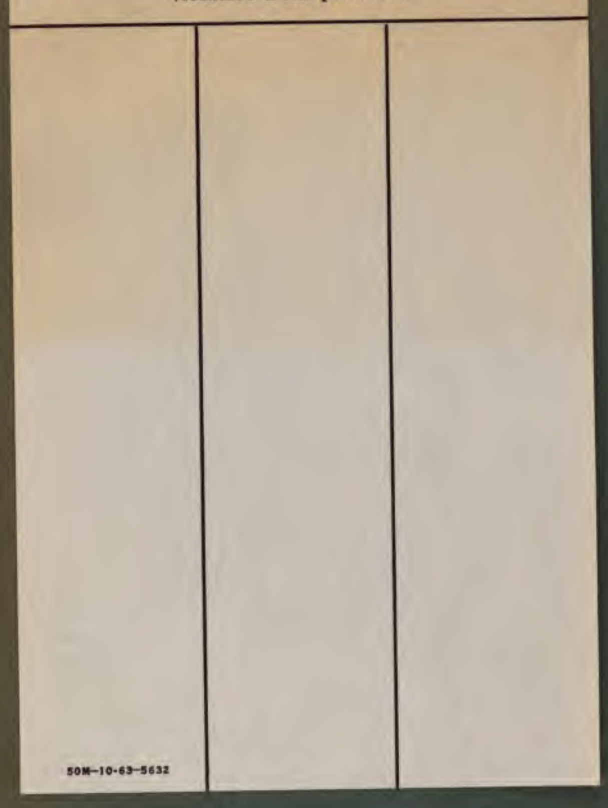
On évite ces accidents en procédant suivant les règles indiquées ; lorsqu'ils se sont produits, on jette les levains contaminés et on en fait d'autres.

Lorsqu'une cuve mise en fermentation par un levain inactif se contamine, il faut : 1° y ajouter de l'acide et 2° y ajouter un nouveau levain plus actif ou simplement de la levure.

TABLE DES MATIÈRES

DEUXIÈME PARTIE

CHARTRES. — IMPRIMERIE DURAND, RUE FULBERT.


LANE MEDICAL LIBRARY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIFORNIA 94304
Ignorance of Library's rules does not exempt violators from penalties.
50M-10-63-5632

NAME	DATE DUE

